

**TOXICIDAD Y EFECTOS SUBLETALES DE LA APLICACIÓN INDIVIDUAL Y  
COMBINADA DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX®411F EN  
RENACUAJOS DE ANUROS COLOMBIANOS**

**LILIANA MARCELA HENAO MUÑOZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Magister en Ciencias Biológicas**

**Director**

**MANUEL HERNANDO BERNAL BAUTISTA. MSc. PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
IBAGUÉ – TOLIMA**

**2014**



UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

**TITULO:** Toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada del glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en renacuajos de anuros colombianos.

**AUTOR:** Liliana Marcela Henao Muñoz

**Código:** 093850052011

**DIRECTOR:** Manuel Hernando Bernal Bautista

**JURADOS:** Carlos Arturo Navas y Julio Mario Hoyos

**CALIFICACIÓN:** 4.6

  x   APROBADO

       REPROBADO

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FIRMAS

Jurado 1

Director del trabajo

Jurado 2

Director del programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 4 de febrero de 2014

*“A mi esposo y amigo Jorge Luis, a mis padres, hermanos y sobrinos que son mi  
felicidad”.*

## AGRADECIMIENTOS

La Autora de esta investigación desea expresar sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al profesor **Manuel Hernando Bernal B.**, de la Universidad del Tolima, por su dirección y asesoría durante el proceso investigativo.

A la bióloga **Teófila María Triana Velásquez**, por sus constantes aportes y colaboración en el desarrollo de esta investigación.

Al **Grupo de Investigación en Herpetología, Eco-Fisiología & Etología** de la Universidad del Tolima, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la **Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico** de la Universidad del Tolima, por la financiación de esta investigación, mediante el proyecto: 220212.

Al programa **Jóvenes Investigadores COLCIENCIAS**, por la beca pasantía otorgada.

A la **Corporación Autónoma Regional del Tolima “CORTOLIMA”**, por expedir el permiso de investigación científica en diversidad biológica (Resolución N° 2886 de 2011) necesario para el desarrollo de este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	16
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	18
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
<b>3. ESTADO DEL ARTE.....</b>	19
3.1 DECLIVE DE LAS POBLACIONES DE ANUROS.....	19
3.1.1 Efecto de los Agroquímicos en los Anuros.....	19
3.2 AGROQUÍMICOS EVALUADOS.....	20
3.2.1 Roundup® Activo.....	20
3.2.1.1 Modo de Acción en Plantas.....	20
3.2.1.2 Efectos Letales y Subletales en Anuros.....	21
3.2.2 Cosmo-Flux®411F.....	22
3.2.2.1 Modo de Acción en Plantas.....	23
3.2.2.2 Efectos Letales y Subletales en Organismos Acuáticos.....	23
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	25
4.1 ESPECIES DE ESTUDIO.....	25
4.1.1 <i>Rhinella marina</i> .....	25
4.1.2 <i>Rhinella humboldti</i> .....	25
4.1.3 <i>Engystomops pustulosus</i> .....	26
4.1.4 <i>Hypsiboas crepitans</i> .....	26
4.2 LUGARES DE COLECTA.....	29
4.2.1 Corregimiento Potrerillo, Municipio de Coello.....	29

<b>4.2.2</b> Payandé, Municipio de San Luis.....	29
<b>4.2.3</b> Universidad del Tolima, Municipio de Ibagué.....	29
<b>4.3</b> METODOLOGÍA DE CAMPO.....	31
<b>4.4</b> DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA MEZCLA GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS.....	32
<b>4.4.1</b> Experimentos en Condiciones de Laboratorio.....	32
<b>4.4.2</b> Experimentos en Condiciones de Microcosmos.....	35
<b>4.5</b> DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA APLICACIÓN INDIVIDUAL DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMOFLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS.....	38
<b>4.5.1</b> Experimentos en Condiciones de Laboratorio.....	38
<b>4.5.2</b> Experimentos en Condiciones de Microcosmos.....	39
<b>4.6</b> EVALUACIÓN DE EFECTOS SUBLETALES EN RENACUAJOS DE ANUROS AL SER EXPUESTOS A LA APLICACIÓN INDIVIDUAL Y COMBINADA DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX®411F.....	40
<b>4.6.1</b> Tamaño Corporal.....	40
<b>4.6.2</b> Capacidad Locomotora.....	41
 <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>5.1</b> TOXICIDAD DE LA MEZCLA GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS.....	42
<b>5.1.1</b> Toxicidad en Condiciones de Laboratorio.....	42
<b>5.1.2</b> Toxicidad en Condiciones de Microcosmos.....	45
<b>5.2</b> TOXICIDAD DE LA APLICACIÓN INDIVIDUAL DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y EL COSMOFLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS.....	46
<b>5.2.1</b> Toxicidad en Condiciones de Laboratorio.....	46
<b>5.2.2</b> Toxicidad en Condiciones de Microcosmos.....	48
<b>5.3</b> EFECTOS SUBLETALES EN RENACUAJOS DE ANUROS.....	51

<b>5.3.1 Mezcla Glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3.1.1 Tamaño Corporal.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3.1.2 Capacidad Locomotora.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3.2 Aplicación Individual del Glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3.2.1 Tamaño Corporal.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3.2.2 Capacidad Locomotora.....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>LISTA DE REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados en las diferentes áreas de colecta.....	32
<b>Tabla 2.</b> Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones experimentales en las pruebas de laboratorio para la mezcla glifosato y Cosmo-Flux®411F....	34
<b>Tabla 3.</b> Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos para la mezcla glifosato y Cosmo-Flux®411F.....	37
<b>Tabla 4.</b> Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones experimentales en las pruebas de laboratorio para el glifosato y Cosmo-Flux®411F.....	38
<b>Tabla 5.</b> Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos para el glifosato y Cosmo-Flux®411F.....	39
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de mortalidad, valores de CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio.....	42
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de mortalidad de las especies expuestas a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.....	45
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de mortalidad, valores de CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Roundup® Activo bajo condiciones de laboratorio.....	46



<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de mortalidad, valores de CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio.....	46
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de mortalidad, valores de CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Roundup® Activo bajo condiciones de microcosmos.....	49
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de mortalidad, valores de CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Especies de estudio y sus posturas de huevos. <b>a)</b> <i>Rhinella marina</i> , <b>b)</b> <i>Rhinella humboldti</i> , <b>c)</b> <i>Engystomops pustulosus</i> y <b>d)</b> <i>Hypsiboas crepitans</i> ..	28
<b>Figura 2.</b> Ubicación geográfica de los lugares de colecta de las posturas en el departamento del Tolima.....	30
<b>Figura 3.</b> Colecta de posturas de huevos de las especies de estudio.....	31
<b>Figura 4.</b> Toma de los parámetros fisicoquímicos en los lugares de colecta...	31
<b>Figura 5.</b> Montaje experimental de las pruebas de toxicidad en condiciones de laboratorio.....	34
<b>Figura 6.</b> Gráfico representativo del montaje experimental de microcosmos...	36
<b>Figura 7. a.</b> Montaje experimental de las pruebas de toxicidad en microcosmos y <b>b.</b> aspersión de la mezcla en microcosmos.....	37
<b>Figura 8.</b> Mediciones morfométricas registradas en los renacuajos de estudio	40
<b>Figura 9.</b> Montaje experimental de las pruebas de desempeño locomotor.....	41
<b>Figura 10.</b> Gráfica de distribución de los valores de CL <sub>50</sub> de los renacuajos expuestos a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F y para otras formulaciones de glifosato.....	44
<b>Figura 11.</b> Representación de los valores de CL <sub>50</sub> en las especies de estudio expuestas al glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones controladas de laboratorio.....	47
<b>Figura 12.</b> Comparación de los valores de CL <sub>50</sub> de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos.....	51

<b>Figura 13.</b> Media de las variables morfométricas evaluadas de los renacuajos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio.....	52
<b>Figura 14.</b> Media y desviación estándar de la máxima velocidad alcanzada y la máxima distancia recorrida por los renacuajos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos.....	53
<b>Figura 15.</b> Promedio del ancho corporal en las cuatro especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio.....	54
<b>Figura 16.</b> Promedio de las medidas morfométricas de las especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.....	55
<b>Figura 17.</b> Media y desviación estándar de la máxima velocidad alcanzada y la máxima distancia recorrida por los renacuajos sobrevivientes a la exposición en condiciones de laboratorio y microcosmos de la aplicación individual del glifosato (Roundup® Activo) <b>(a)</b> , y del Cosmo-Flux®411F <b>(b)</b> .....	57

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Fotografías de las presentaciones comerciales de los agroquímicos empleados <b>1.</b> Roundup® Activo y <b>2.</b> Cosmo-Flux®411F.....	68
<b>Anexo B.</b> Fotografías de los lugares de colecta de las posturas de huevos de las especies de estudio en el departamento del Tolima: <b>1.</b> Corregimiento Potrerillo, municipio de Coello, <b>2.</b> Payandé, municipio de San Luis y <b>3.</b> Universidad del Tolima, municipio de Ibagué.....	69
<b>Anexo C.</b> Gráfica de tendencia general de los parámetros fisicoquímicos en los experimentos realizados bajo condiciones de microcosmos en las pruebas de toxicidad de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F.....	71
<b>Anexo D.</b> Gráfica de tendencia general de los parámetros fisicoquímicos en los experimentos realizados bajo condiciones de microcosmos en las pruebas de toxicidad de la aplicación individual del <b>1.</b> glifosato (Roundup® Activo) y <b>2.</b> del Cosmo-Flux®411F.....	72
<b>Anexo E.</b> Resumen de resultados.....	74

## RESUMEN

La mezcla del glifosato con el Cosmo-Flux®411F se utiliza en Colombia para la erradicación de los cultivos ilícitos y malezas agrícolas; sin embargo, esta combinación puede afectar a los organismos acuáticos no blanco como los anuros. Este estudio evaluó los efectos tóxicos y subletales (cambios en el tamaño corporal y en el desempeño locomotor) de la aplicación individual y combinada del glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F en cuatro especies de renacuajos (estadío 25) colombianos bajo condiciones de laboratorio y microcosmos.

En laboratorio, los CL<sub>50</sub> hallados para la exposición individual y combinada del glifosato (Roundup® Activo) y del Cosmo-Flux®411F fueron mayores a las concentraciones sugeridas de aplicación en campo, indicando un efecto tóxico, en contraste con lo encontrado en los microcosmos, en donde la aplicación individual y combinada de estos dos agroquímicos no resultó tóxica (CL<sub>50</sub> menores a las concentraciones de aplicación). Los resultados también indican que la toxicidad de la mezcla está dada principalmente por el glifosato, ya que no se presentaron diferencias significativas con respecto a la toxicidad generada por la aplicación individual del glifosato (Roundup® Activo). De otra parte, a las concentraciones de aplicación en campo, el coadyuvante Cosmo-Flux®411F afectó significativamente el tamaño corporal de los organismos, tanto en la mezcla con el glifosato (Roundup® Activo) como en su aplicación individual, en condiciones de laboratorio, pero no en los microcosmos. El glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F aplicados de manera individual y combinada a concentraciones subletales (inferiores a los valores de CL<sub>50</sub>), tampoco afectaron el desempeño locomotor de ninguna de las especies de estudio. En conclusión, al comparar la concentración de glifosato empleada en la erradicación de cultivos ilícitos (3,69 Kg a.e./ha), o la concentración recomendada para la agricultura (1,77 Kg a.e./ha), y la dosis máxima de aplicación sugerida para el Cosmo-Flux®411F (1 L/ha), con respecto a los CL<sub>50</sub> hallados para el glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos, las cuales semejan en mayor medida las

condiciones reales de campo, estos valores fueron particularmente mayores y en consecuencia no resultaron letales para las especies de anuros estudiados.

**Palabras clave:** Anuros, Desempeño locomotor, Tamaño corporal, Toxicidad.

## ABSTRACT

The mixture of glyphosate and Cosmo-Flux®411F is used in Colombia to eradicate illicit crops and agricultural weeds. However, this combination can affect non-target aquatic organisms such as frogs. This study evaluated the toxic and sublethal effects (changes in body size and locomotor performance) of the individual and combined application of glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux®411F to four species of Colombian tadpoles (stage 25) exposed under laboratory and microcosm tests.

In laboratory, the LC<sub>50</sub> for glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux®411F were toxic to the four species of frogs when applied individually and combined. On contrary, in microcosms, the individual and combined applications of these two agrochemicals were not toxic. The results indicate that the toxicity of the mixture is mainly given by the glyphosate more than the Cosmo-Flux®411F, as significant differences in toxicity were not generated by the individual application of glyphosate (Roundup® Active) with respect to the mix. On the other hand, at the concentration suggested to apply in field, the adjuvant Cosmo-Flux®411F affected the body size of tadpoles in laboratory, but not in microcosms, when was applied individually and combined with the glyphosate (Roundup® Active). At sublethal concentrations, below the LC<sub>50</sub> values, the glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux®411F did not affect the locomotor performance of any species, neither under laboratory nor microcosm conditions. In conclusion, comparing the concentration of glyphosate used in the eradication of illicit crops (3,69 kg a.e./ha) or the recommended for the agriculture (1,77 kg a.e./ha), and the concentration of Cosmo-Flux®411F suggested to spray in (1 L/ha), with respect to the LC<sub>50</sub> found for the glyphosate (Roundup® Active) and Cosmo-Flux®411F applied individually and combined under microcosm conditions, which are more similar to the field conditions, these values were particularly higher and consequently did not show lethal effects for the studied species.

**Keywords:** Anurans, Body size, Locomotor performance, Toxicity.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente se ha desatado gran controversia por el uso desmesurado que se le da al glifosato, al ser el herbicida de mayor uso comercial en el mundo (Duke & Powles, 2008). En Colombia, es empleado no solo en el programa de erradicación de cultivos ilícitos de coca y amapola (Solomon, Anadón, Carrasquilla, Cerdeira, Marshall & Sanin, 2007), sino en la agricultura convencional y transgénica. Actualmente se han adelantado estudios de los posibles efectos nocivos causados por el glifosato a las diferentes formas de vida y al ambiente en general, ya sea de una forma directa o indirecta, pero en especial en los anfibios, los cuales se consideran como el grupo más sensible entre los vertebrados.

El glifosato requiere ser aplicado en combinación con un coadyuvante que facilite su fijación y penetración en las hojas, el Cosmo-Flux®411F es uno de estos coadyuvantes ampliamente utilizado con el glifosato en Colombia y del cual no existen estudios de toxicidad en anuros; sin embargo, en un trabajo previo realizado por Bernal, Solomon y Carrasquilla (2009 a y b), se encontró que bajo condiciones de laboratorio los renacuajos de ocho especies de anuros colombianos resultan muy sensibles a la exposición de la mezcla glifosato (Glyphos®) y Cosmo-Flux®411F, tal y como se usa en el programa de erradicación de cultivos ilícitos y en la agricultura, y sus valores de letalidad fueron cercanos a los encontrados en otras especies de anuros. Sin embargo, en las pruebas de microcosmos en campo no se encontró una mortalidad alta. Adicionalmente estudios recientes en peces indican que la alta toxicidad del herbicida podría estar relacionada con la adición del coadyuvante Cosmo-Flux®411F (Rondón, Ramírez & Eslava, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo evalúa la toxicidad y efectos subletales (cambios en el tamaño corporal y en el desempeño locomotor) del uso individual y combinado del glifosato en su presentación comercial Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos, en condiciones controladas de laboratorio y microcosmos.



## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia, el herbicida glifosato es ampliamente utilizado en la agricultura para la erradicación de malezas y sólo entre el 10% y el 14% del uso total es utilizado para el programa de erradicación de cultivos ilícitos (Solomon, Anadón, Cerdeira, Marshall & Sanin, 2005). En varios estudios se ha encontrado que el uso del glifosato y Cosmo-Flux®411F podría presentar riesgos moderados en organismos acuáticos de aguas superficiales poco profundas que sean asperjadas, pero que podría ser letal en los anfibios, al ser un grupo altamente sensible a los cambios ambientales (Collins & Storfer, 2003; Duellman & Trueb, 1986; Matton, 2000; Solomon et al., 2007). No obstante, los estudios con anfibios se han hecho principalmente en países de zonas templadas y con especies que no se encuentran en Colombia, a excepción de un trabajo realizado por Bernal et al., (2009 a y b) quienes llevaron a cabo un estudio de la toxicidad de esta mezcla en renacuajos, juveniles y adultos de anuros colombianos; sin embargo, aún se desconoce la toxicidad del producto comercial Roundup® Activo y del Cosmo-Flux®411F en estos organismos. Por lo anterior, en este trabajo se determina el efecto tóxico de la aplicación individual del glifosato (Roundup® Activo) y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos, para compararlo con la toxicidad generada por la mezcla glifosato-Cosmo-Flux®411F tal y como se asperja en campo.

Por otra parte, ya que algunas concentraciones de glifosato y Cosmo-Flux®411F no necesariamente causan la muerte directa en los anuros, pero pueden generar efectos subletales, tales como alteraciones en su tamaño corporal y locomoción, lo que podría incidir en la sobrevivencia próxima de los organismos, en este trabajo también se evalúan estos efectos subletales.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos tóxicos y subletales de la aplicación individual y combinada del herbicida glifosato (Roundup® Activo) y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F en renacuajos (estadío 25) de cuatro especies de anuros colombianos, bajo condiciones controladas de laboratorio y microcosmos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- a.** Determinar la toxicidad de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) con el Cosmo-Flux®411F en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos.
- b.** Establecer la toxicidad de la aplicación individual del herbicida glifosato (Roundup® Activo) y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F en renacuajos de cuatro especies de anuros colombianos.
- c.** Comparar los valores de toxicidad (CL<sub>50</sub>) de la mezcla con respecto a la aplicación individual del herbicida glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F en los renacuajos de las cuatro especies de estudio.
- d.** Evaluar el efecto en el tamaño corporal y en el desempeño locomotor en cuatro especies de anuros expuestos al glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F aplicados de manera individual y combinada bajo dos condiciones experimentales.

### **3. ESTADO DEL ARTE**

#### **3.1 DECLIVE DE LAS POBLACIONES DE ANUROS**

Actualmente es conocido el declive acelerado que sufren las poblaciones de anuros a nivel mundial (Blaustein & Wake, 1995). Factores como el aumento de la radiación ultravioleta, incrementos en la temperatura ambiental, la minería, la explotación maderera y la introducción de especies invasoras, entre otros, son considerados como posibles causas de este declive (Instituto A. von Humboldt, 2010; Matton, 2000; Storfer, 2003), además de la contaminación por agroquímicos (Collins & Storfer, 2003; Hayes et al., 2006), la cual ha sido objeto de múltiples estudios.

A pesar de que los agroquímicos son sustancias químicas destinadas a proteger a las plantas contra organismos nocivos y malezas, su aplicación afecta simultáneamente a organismos no blanco como los anuros (Relyea, 2012; Plötner & Matschke, 2012; Wagner & Lötters, 2013). Por lo tanto, es importante determinar el efecto toxico de esos agroquímicos sobre diferentes estadios de desarrollo de estos organismos.

**3.1.1 Efecto de los Agroquímicos en los Anuros.** Los anuros son organismos particularmente sensibles a la aplicación de productos agrícolas, lo cual puede ser atribuido a tres razones: primero, los anuros se caracterizan por tener una piel altamente permeable, la cual permite el flujo continuo del contaminante al interior de los organismos, haciéndolos más vulnerable en comparación con otros organismos; segundo, los anuros dependen en gran medida de los cuerpos de agua para su supervivencia, reproducción y desarrollo, por ser el medio acuático el lugar de desove de la mayoría de las especies; y tercero, la fuente de alimento de larvas, juveniles y adultos puede verse afectado cualitativa y cuantitativamente por la presencia de agroquímicos (Plötner & Matschke, 2012).

Estudios anteriores han reportado efectos tóxicos, subletales e indirectos de diferentes agroquímicos en anuros; sin embargo, se requieren más estudios dado el incremento del uso de productos químicos en la agricultura. Esto se aplica en particular a los herbicidas a base de glifosato que son los más utilizados en el mundo (Duke & Powles, 2008).

### **3.2 AGROQUÍMICOS EVALUADOS**

En este trabajo se evaluó la toxicidad y efectos subletales de la aplicación individual y combinada de la presentación comercial de glifosato Roundup® Activo y del coadyuvante Cosmo-Flux®411F (Anexo A). Estos agroquímicos son utilizados no solo en la agricultura convencional y transgénica, sino que además se aplican de manera conjunta en el programa de erradicación de cultivos ilícitos en Colombia (Solomon et al., 2005).

**3.2.1 Roundup® Activo.** Es un herbicida sistémico, no selectivo para el control post-emergente de malezas gramíneas, ciperáceas y de hoja ancha. El Roundup® Activo tiene una concentración de 363 g/L de ácido de glifosato de formulación a 20°C, equivalente a 446 g/L de sal potásica de N-(fosfonometil)-glicina. El producto cuenta con licencia de venta número 470 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Cosmoagro, 2013). De acuerdo a la clasificación del Ministerio de Salud de Colombia este se encuentra en la categoría toxicológica III (ligeramente peligroso para la salud humana). La concentración de glifosato sugerida para su aplicación en la agricultura es de 1,77 Kg a.e./ha (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007) y para el control de cultivo ilícitos en Colombia es 3,69 Kg a.e./ha (Bernal et al., 2009a).

**3.2.1.1 Modo de Acción en Plantas.** El glifosato inhibe la actividad de la enzima enolpiruvil-siquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (Steinrücken & Amrhein, 1980). Esta enzima está presente en los cloroplastos de las plantas superiores, en algas, bacterias,

hongos y protozoarios, es esencial para el metabolismo normal y para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Plötner & Matschke, 2012).

La enzima EPSPS es esencial para la formación de los aminoácidos: fenilalanina, triptófano y tirosina, los cuales contribuyen a la formación de proteínas y sustancias de defensa, afectando principalmente la actividad de las células proliferantes de los meristemas de los brotes y raíz. Adicionalmente, el glifosato altera el transporte de fitohormonas de las plantas, por lo que genera absorción, complejización de los nutrientes y posterior formación de metales pesados como manganeso (Matschke & Machackova, 2002). También, el daño acelerado de las proteínas generado por el glifosato altera el equilibrio hormonal de la planta conduciendo a la reducción de la vitalidad, haciendo a las plantas más propensas a daños o alteraciones, ya que las proteínas como materiales de reserva y reguladores enzimáticos, no sólo se utilizan en la configuración de las estructuras celulares, sino que también están directamente relacionadas con el comportamiento de defensa de la planta (Plötner & Matschke, 2012).

**3.2.1.2 Efectos Letales y Subletales en Anuros.** Estudios sobre los efectos del glifosato y sus productos formulados han concluido que este resulta de mediana a altamente tóxico para las especies de anuros; por ejemplo, Williams y Semlitsch (2010) registran una mortalidad del 80% en organismos de *Pseudacris triseriata* al ser expuestas a 572 ppb a.e. de glifosato, concentración considerada por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) como protectora de la salud humana. También, Chen, Hathaway y Folt (2004), quienes evaluaron la toxicidad del glifosato en su presentación Vision®, encontraron que estresores como el pH y la disponibilidad del alimento potencian la toxicidad del glifosato, aumentando su letalidad. De igual forma, Edginton, Sheridan, Stephenson, Thompson y Boermans (2004) encontraron altas toxicidades en embriones y larvas de anuros cuando estos fueron expuestos al efecto interactivo del glifosato y pH. También, trabajos realizados bajo condiciones de laboratorio como los de Wojtaszek, Staznik, Chartrand, Stephenson y Thompson (2004), Relyea (2004, 2005) y Bernal et al. (2009a) mostraron alta toxicidad del

glifosato en los anuros expuestos. Sin embargo, cuando los experimentos se realizan bajo condiciones de microcosmos se observó una reducción significativa en la toxicidad del glifosato (Bernal et al., 2009b, Wojtaszek et al., 2004).

En la actualidad se han reportado múltiples efectos morfológicos y fisiológicos en anuros expuestos al glifosato (Lajmanovich, Lorenzatti, Maitre, Enrique & Peltzer, 2003); dentro de los efectos morfológicos se encuentran: la presencia de deformidades en la cola (Williams & Semlitsch, 2010) y en el intestino de las larvas (Lenkowski, Sanchez-Bravo & McLaughlin, 2010), defectos en el desarrollo de la cresta neural y el esqueleto craneofacial (Mann, Hyne, Choung & Wilson, 2009). También, Cauble y Wagner (2005) indican que las larvas de *Rana cascadae* al ser expuestas a una concentración de 1 mg/L de glifosato presentan una menor masa corporal en comparación con el grupo control. Dentro de los efectos fisiológicos, Costa, Montairo, Oloveira-Neto, Rantin y Kalinin (2008) reportan alteraciones en la actividad de las enzimas hepáticas en *Lithobates catesbeiana* a una concentración subletal del glifosato (1 ppm). También, se han observado múltiples efectos sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas en los anuros expuestos (Mann et al., 2009; Howe et al., 2004) y se han encontrado alteraciones en el ADN (Mann et al., 2009) y en la síntesis de ARN en anuros (Howe et al., 2004).

**3.2.2 Cosmo-Flux®411F.** Es un coadyuvante estéreo-específico de carácter no-iónico, cuyo ingrediente activo constituye una mezcla de esteres de hexitan (17%): alcoholes lineales + aryl etoxilado, mezclas de tensoactivos estereoespecíficos no-iónicos, alcoholes lineales etoxilados propoxilados con pequeñas cantidades de compuesto aryl etoxilado. Como ingredientes aditivos contiene isoparafinas líquidas (83%), descritas como aceite isoparafínico de alta pureza, muy baja fitotoxicidad, muy bajo contenido de aromáticos y baja tensión superficial que mejora la humectabilidad, promoviendo así la eficacia de los ingredientes activos.

De acuerdo a Cosmoagro® (2013), empresa que se encarga de la comercialización del Cosmo-Flux®411F, debe ser aplicado de 0,5 a 1 L/ha, o entre 1,5 y 10 ml/L, equivalente

a 255 y 1700 mg/L. Este producto cuenta con la licencia de venta número 2186, expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Cosmoagro, 2013). Se encuentra clasificado por el Ministerio de Salud de Colombia en la categoría toxicológica IV (ligeramente tóxico para la salud humana).

**3.2.2.1 Modo de Acción en Plantas.** Los coadyuvantes como el Cosmo-Flux®411F reducen la tensión superficial de la pared celular de las plantas, alterando la permeabilidad de las membranas biológicas y las barreras de difusión (Rondón et al., 2007). De este modo el Cosmo-Flux®411F interactúa directamente con el glifosato facilitando su fijación y penetración en las hojas.

La importancia del uso del Cosmo-Flux®411F radica en que mejora la adherencia y uniformidad de la mezcla emulsionada, controlando la evaporación e hidrólisis del ingrediente activo con cubrimiento total, garantizando su concentración homogénea por unidad de área (Eslava, Ramirez & Rondón, 2007). Así, el incremento de la acción tóxica de los herbicidas o pesticidas no obedece a reacciones químicas con el coadyuvante sino a acciones físicas que hacen más eficiente el contacto con el objetivo. El Cosmo-Flux®411F incrementa sustancialmente la acción biológica de los agroquímicos, permitiendo mayor acción con menores dosis (Eslava et al., 2007).

**3.2.2.2 Efectos Letales y Subletales en Organismos Acuáticos.** El Cosmo-Flux®411F es considerado tóxico para peces, algas y dafnias (Cosmoagro, 2013); sin embargo, la ficha técnica indica que manteniendo las concentraciones adecuadas el coadyuvante no debe representar problemas ecológicos, aunque allí no se aclara cuáles deberían ser las concentraciones adecuadas.

Rondón et al. (2007) evaluaron la toxicidad y efectos subletales del Cosmo-Flux®411F en Cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) encontrando que este es letal a concentraciones lejanas a las aplicadas en campo; además, reportan que dicha exposición produce múltiples efectos patológicos y cambios degenerativos en el pez, tales como palidez del hígado, acumulación de material mucoso en las branquias,

vacuolización de hepatocitos, hiperplasia de células epiteliales, vacuolización de enterocitos, aumento de centros melanomacrófagos renales, gliosis, degeneración neuronal e infiltración de células granulares eosinofílicas/células mastocitos en telencéfalo, incluso observaron una leve disminución de la actividad de nado.

En la actualidad no existen estudios que evalúen el efecto tóxico del Cosmo-Flux®411F en anuros, aunque Bernal et al. (2009 a y b) evaluaron el efecto tóxico de la mezcla glifosato (Glyphos®) y Cosmo-Flux®411F en renacuajos, juveniles y adultos de anuros colombianos, encontrando que no producía un efecto ecológicamente letal.



## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 ESPECIES DE ESTUDIO

Las especies de estudio fueron seleccionadas por presentar un elevado número de huevos por postura (Guayara-Barragán & Bernal, 2012), no encontrarse en alguna categoría de amenaza para su conservación (UICN, 2013) y por hallarse comúnmente asociadas a áreas de cultivo asperjadas con los agroquímicos de estudio.

**4.1.1 *Rhinella marina*** (Linnaeus 1758). Se conoce comúnmente como sapo de la caña o sapo marino. Presenta un par de glándulas parotoideas muy destacadas, con un cuerpo robusto y una región post-axilar igual o más ancha que la cabeza. La longitud rostro-cloaca del macho es de 85-145 mm y de la hembra 90-175 mm (Savage, 2002. Pág: 200) (Figura 1a).

*R. marina* se distribuye ampliamente en el continente americano, abarcando desde el sur de Texas en Estados Unidos, pasando América central, hasta la región norte de América del Sur (UICN, 2013). Sus límites altitudinales van desde 0 a 1600 m.s.n.m. (AmphibiaWeb, 2013). La especie habita tanto lugares degradados como bosques lluviosos; sin embargo, se encuentran más frecuentemente en hábitats abiertos o perturbados, tales como pantanos, pastizales bajos y zonas que están cerca de los asentamientos humanos (Savage, 2002. pág: 200; UICN, 2013). Las posturas de esta especie se componen de cadenas de huevos de color negro en agua lóaticas (Guayara-Barragán & Bernal, 2012) (Figura 1a).

**4.1.2 *Rhinella humboldti*** (Gallardo 1965). Se caracteriza por presentar glándulas parotoideas detrás de los ojos y un cuerpo más grande que la cabeza después de la región post-axilar (Figura 1b).

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la costa norte de Colombia, a través de Venezuela desde la cuenca norte del Orinoco hasta las zonas más bajas de Trinidad. Sus límites altitudinales van desde 400 a 1600 m.s.n.m. En general, es una especie terrestre que habita tierras bajas, llanuras, sabanas y bosques secos. Se encuentra asociada a áreas agrícolas abiertas (AmphibiaWeb, 2013). Se reproduce en estanques temporales y permanentes. Las posturas de esta especie se componen de cadenas de huevos de color negro en charcas temporales o aguas lenticas (Guayara-Barragán & Bernal, 2012) (Figura 1b).

**4.1.3 *Engystomops pustulosus* (Cope 1864).** Se conoce comúnmente como rana túngara. Estos organismos presentan un cuerpo robusto, la longitud rostro-cloacal de los machos es de 25-34 mm y de las hembras 26-35 mm (Savage, 2002. pág: 224) (Figura 1c).

Esta especie se encuentra distribuida en América Central desde México hasta el este de Panamá. En Sudamérica se encuentra en Colombia, en el valle del Magdalena hasta el río Orinoco en Venezuela. Es una especie principalmente de tierras bajas que se halla hasta 1540 m.s.n.m. (UICN, 2013). *E. pustulosus* se puede encontrar en bosque montano y bosque seco tropical. Habitan frecuentemente cerca de estanques tanto naturales como artificiales, aunque también hacen uso de pequeños cuerpos de agua, tales como zanjas y charcos (AmphibiaWeb, 2013). Sus posturas son colocadas en charcas temporales en nidos de espumas (Duellman & Trueb, 1986), que contienen huevos de color crema o blanco (Guayara-Barragán & Bernal, 2012) (Figura 1c).

**4.1.4 *Hypsiboas crepitans* (Wied-Neuwied 1824).** Se conoce también como rana blanca, rana cantora o rana platanera. Se caracteriza por presentar un tímpano visible y separado del ojo. La piel de la parte superior de la boca, al igual que la piel que recubre al tímpano, es finamente granular (Cochran & Goin, 1970) (Figura 1d).

Se encuentra distribuida ampliamente en Colombia desde los 5 hasta los 2450 m.s.n.m. Esta especie tiene una gran variedad de hábitats, desde bosques húmedos tropicales,

ambientes semiáridos, praderas, llanos, hábitats intermedios, pastos y bosques montanos bajos. La especie se reproduce en charcas temporales al inicio de la temporada de lluvias. Es posible encontrar esta especie en hábitats gravemente degradados, incluidos las zonas urbanas y las viviendas humanas (UICN, 2013). Sus huevos son de color negro y son puestos en una capa gelatinosa a manera de película sobre la superficie de aguas lenticas (Guayara-Barragán & Bernal, 2012) (Figura 1d).

**Figura 1.** Especies de estudio y sus posturas de huevos. **a)** *Rhinella marina*, **b)** *Rhinella humboldti*, **c)** *Engystomops pustulosus* y **d)** *Hypsiboas crepitans*.



Fuente: Grupo de Investigación en Herpetología, Eco-Fisiología & Etología, Universidad del Tolima, 2013.

## 4.2 LUGARES DE COLECTA

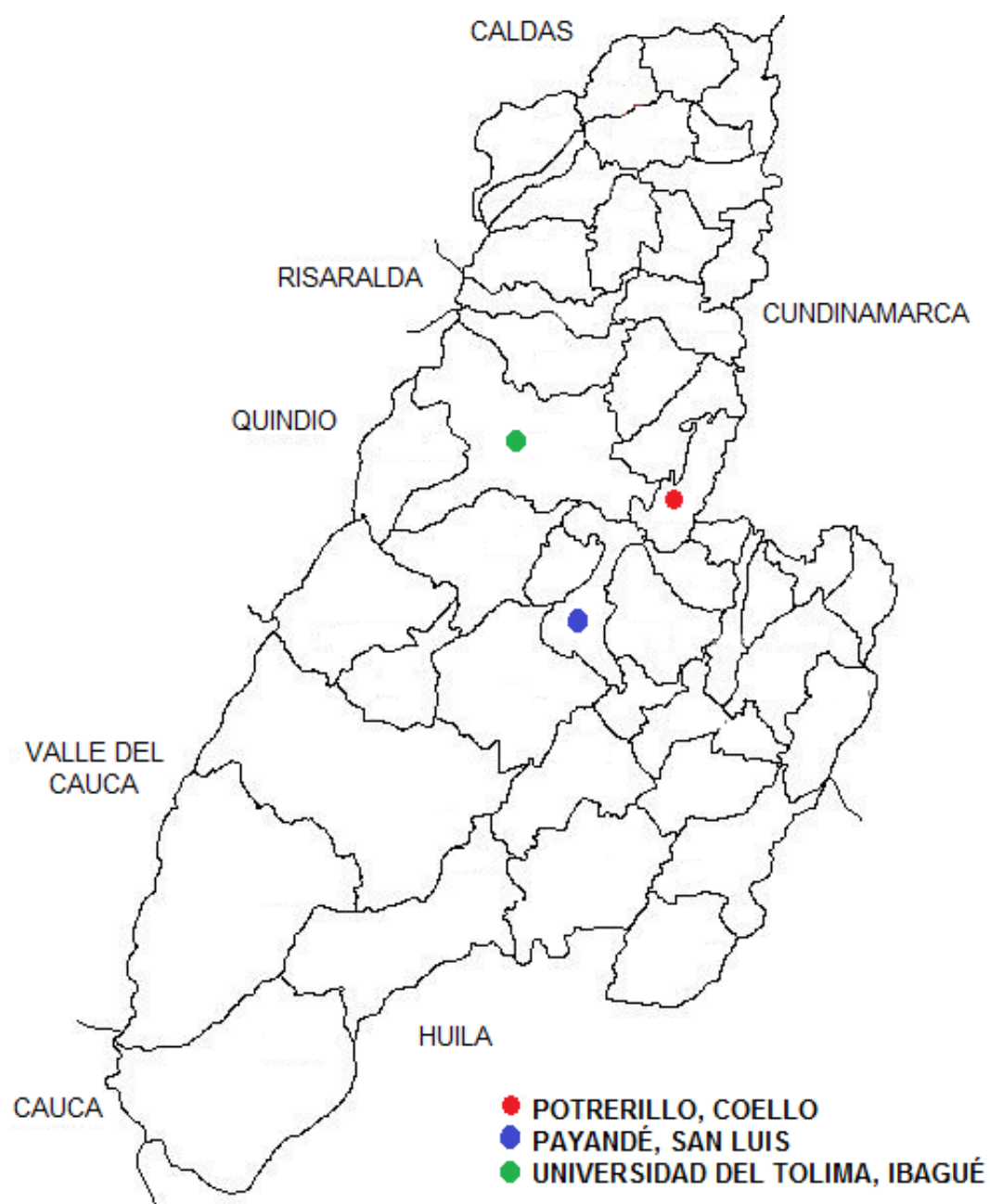
Las posturas de las especies de estudio se colectaron en diferentes localidades del departamento del Tolima, Colombia. La especie *Engystomops pustulosus* y *Hypsiboas crepitans* se encontraron en la vereda Potrerillo del municipio de Coello, *Rhinella marina* en el corregimiento de Payandé del municipio de San Luis, y *Rhinella humboldti* en las instalaciones de la Universidad del Tolima en el municipio de Ibagué (Figura 2) (Anexo B).

**4.2.1** Corregimiento Potrerillo, Municipio de Coello. Las posturas de huevos de las especies de estudio se colectaron en una laguna del corregimiento de Potrerillo, ubicada en una zona típica de bosque seco tropical (04°14'00" N y 74°58'00" W.) a una altitud de 430 m.s.n.m.

**4.2.2** Payandé, Municipio de San Luis. Las posturas de la especie *R. marina* se colectaron a orillas del Río Luisa (04°19'51" N y 75°06'48" W), cuya zona se caracteriza por ser semiárida y por presentar una altitud de 630 m.s.n.m.

**4.2.3** Universidad del Tolima, Municipio de Ibagué. Las posturas de la especie *R. humboldti* se colectaron en charcas temporales formadas dentro de la sede central de la Universidad del Tolima (04°26'20" N y 75°13'56" W), a una altitud de 1200 m.s.n.m.

**Figura 2.** Ubicación geográfica de los lugares de colecta de las posturas en el departamento del Tolima.



Fuente: Autor.

### 4.3 METODOLOGÍA DE CAMPO

Durante las salidas de campo se colectaron entre dos y cuatro posturas de huevos de las especies de estudio (Figura 3). Para la identificación de dichas posturas se tuvo en cuenta la descripción presentada por Guayara-Barragán y Bernal (2012). En las diferentes áreas de colecta se registraron los parámetros fisicoquímicos (Figura 4) de pH y temperatura, cuyos valores medios se muestran en la Tabla 1.

**Figura 3.** Colecta de posturas de huevos de las especies de estudio.



Fuente: Autor.

**Figura 4.** Toma de los parámetros fisicoquímicos en los lugares de colecta.



Fuente: Autor.



**Tabla 1.** Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos registrados en las diferentes áreas de colecta.

Lugares de colecta	pH	Temperatura (°C)
Corregimiento Potrerillo	7,7	26,2
Payandé	8,0	24,3
Universidad del Tolima	6,6	29,2

Fuente: Autor.

Las posturas halladas en campo fueron transportadas en contenedores plásticos al Laboratorio de Herpetología de la Universidad del Tolima, donde se mantuvieron en agua declorada, aireación continua y temperatura ambiente, hasta que los organismos alcanzaron el estadio 25 (Gosner, 1960) con los cuales se realizaron los experimentos.

#### **4.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA MEZCLA GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS**

Para la determinación de la toxicidad de la mezcla en renacuajos de anuros, los agroquímicos fueron combinados en una proporción de 0,023 µl del coadyuvante Cosmo-Flux®411F por 1 µl de glifosato (2,3% v/v), para obtener la concentración de la mezcla asperjada en campo, de acuerdo con su aplicación general en el programa de erradicación de cultivos ilícitos (3,69 kg a.e./ha = 5392,92 µg a.e./L) (Bernal et al., 2009a), la cual es más alta que la sugerida de aplicación agrícola.

**4.4.1 Experimentos en Condiciones de Laboratorio.** Durante 96 horas, diez renacuajos de cada especie más su réplica fueron expuestos por separado a cinco diferentes concentraciones (n= 20 por concentración) de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F: 0 (control negativo, agua declorada); 325; 750; 1500; 3000 y 6000 µg glifosato a.e./L.



Los renacuajos se expusieron en un litro de la solución experimental (10 renacuajos/litro), preparada con agua previamente declorada dentro de peceras de vidrio con capacidad para 2 litros (Figura 5). El experimento consistió en un sistema semiestático en donde las soluciones fueron renovadas totalmente cada 24 horas, esto con el fin de mantener constantes las concentraciones de los químicos evaluados, puesto que se ha encontrado que estas disminuyen al cabo de 24 horas (Trumbo, 2005). Antes y después de los recambios se registraron a una profundidad media los parámetros fisicoquímicos de conductividad (Hanna HI 8033), oxígeno disuelto (Hanna HI 9146), alcalinidad (Hanna HI 3811), dureza (Hanna HI 3812), temperatura y pH (Hanna HI 9126), cuya media y desviación estándar se muestra en la Tabla 2. Los experimentos se realizaron con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12:12 horas, mantenida a través de lámparas de luz blanca (Phillips TLT 20W/54RS) conectadas a un temporizador digital (General Electric PM621). La toxicidad de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F se determinó a través de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para cada una de las especies. Estos valores se calcularon de acuerdo a la mortalidad acumulada en cada una de las concentraciones experimentales a las 96 horas, a través del método TSK Trimmed Spearman-Kärber (Versión 1.5).

**Figura 5.** Montaje experimental de las pruebas de toxicidad en condiciones de laboratorio.



Fuente: Autor.

**Tabla 2.** Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones experimentales en las pruebas de laboratorio para la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F.

<b>Fisicoquímicos</b>	<b>Antes del recambio</b>	<b>Después del recambio</b>
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	263,8 (40,79)	242,8 (35,51)
Oxígeno (ppm)	6,07 (0,82)	6,65 (0,82)
pH	7,42 (0,66)	7,50 (0,61)
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24,85 (1,08)	22,89 (0,76)
Alcalinidad (mg/L)	55,88 (9,60)	59,25 (12,04)
Dureza (ppm)	95 (28,21)	92,63 (23,09)

Fuente: Autor.

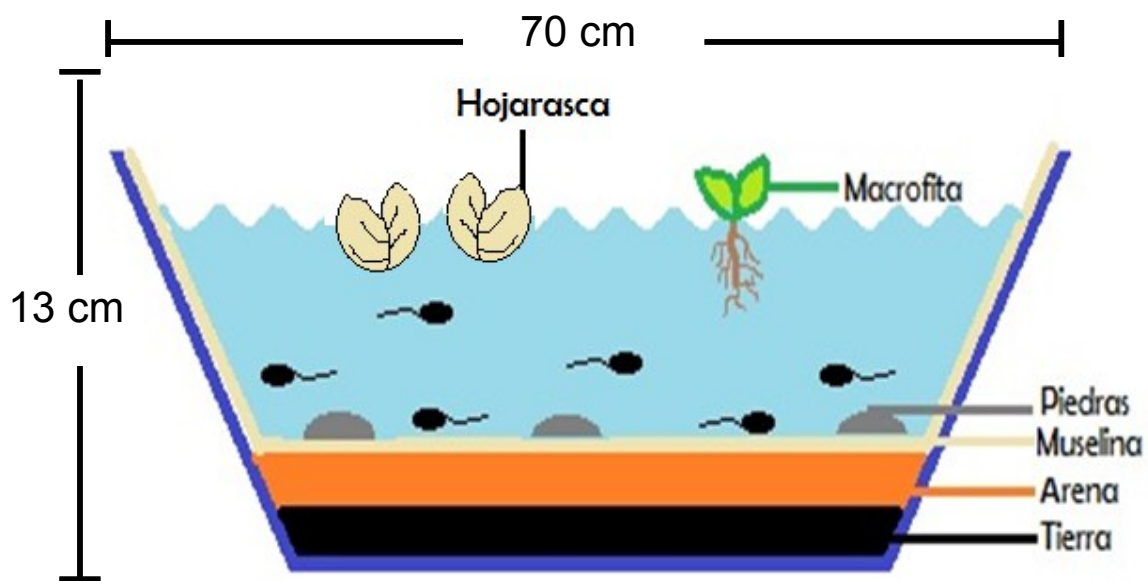
**4.4.2 Experimentos en Condiciones de Microcosmos.** Durante 96 horas, veinticinco renacuajos de todas las especies más su réplica fueron expuestos separadamente a diferentes concentraciones (n= 50 por concentración) de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F: 0 (control negativo); 3,69; 7,38; 14,76 y 29,52 Kg glifosato a.e./ha.

Los microcosmos se elaboraron con recipientes de polietileno de alta densidad de 70 cm de diámetro y 13 cm de profundidad (área= 0,1520 m<sup>2</sup>), a los que se adicionó 450 g de tierra y 645 g de arena obtenidas del jardín botánico de la Universidad del Tolima a una profundidad aproximada de 50 cm. Luego, los recipientes fueron cubiertos con una tela blanca (muselina) sostenida internamente por piedras (4 a 5 piedras de tamaño pequeño), con el objetivo de facilitar la observación y conteo de los organismos al finalizar cada experimento. Posteriormente, 10 L de agua declorada fueron adicionados a cada recipiente (2,5 renacuajos/litro), al igual que hojarasca (2 hojas) y una macrófita (Figura 6). Estos microcosmos fueron colocados de manera aleatoria en un área ventilada del laboratorio, con una temperatura ambiental promedio de 24±2°C y un fotoperiodo fluctuante de 12 horas luz-12 horas oscuridad, aproximadamente. Los microcosmos se dejaron estabilizar durante una hora y posteriormente se colocaron los organismos en el centro de los recipientes y se realizó una única aspersión de 150 ml de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F a las diferentes concentraciones, con una bomba de mano con capacidad de 3 L, a una altura de 20 cm de la superficie del agua. Para evitar la deriva de la mezcla, la aspersión se realizó dentro de un cono invertido de polietileno de 70 cm de diámetro y 13 cm de altura (Figura 7).

Este experimento consistió en un sistema estático sin recambio de las soluciones experimentales, donde los valores de pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura se registraron cada 24 horas hasta finalizar la prueba con los mismos equipos utilizados para las pruebas de laboratorio. También se registró la alcalinidad y dureza de las concentraciones experimentales al iniciar y finalizar la exposición. La media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96

horas de experimentación se muestran en la Tabla 3 (Anexo C). La toxicidad de la mezcla se determinó de la misma manera que en las pruebas de laboratorio. Para la realización de estos experimentos se siguió la definición de microcosmos de Van Leeuwen y Vermeire (2007, Pág. 311), quienes afirman que son experimentos que se pueden realizar en el laboratorio con la finalidad de estudiar los efectos de los contaminantes simulando algunos aspectos de los sistemas naturales.

**Figura 6.** Gráfico representativo del montaje experimental de microcosmos.



Fuente: Autor.

**Figura 7. a.** Montaje experimental de las pruebas de toxicidad en microcosmos y **b.** aspersión de la mezcla en microcosmos.



Fuente: Autor.

**Tabla 3.** Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos para la mezcla glifosato y Cosmo-Flux®411F.

<b>Fisicoquímicos</b>	<b>0 horas</b>	<b>96 horas</b>
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	279,8 (66,84)	274,6 (33,56)
Oxígeno (ppm)	6,48 (1,08)	5,27 (1,04)
pH	7,40 (0,23)	7,34 (0,34)
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	23,49 (0,63)	22,56 (0,79)
Alcalinidad (mg/L)	61,75 (17,76)	42,25 (13,79)
Dureza (ppm)	107,13 (38,32)	94,75 (25,38)

Fuente: Autor.

## 4.5 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA APLICACIÓN INDIVIDUAL DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX®411F EN RENACUAJOS DE ANUROS

**4.5.1 Experimentos en Condiciones de Laboratorio.** Se siguió el mismo procedimiento citado para la aplicación de la mezcla glifosato-Cosmo-Flux®411F, sólo que en estos experimentos los agroquímicos se evaluaron por separado. El glifosato se estudió a las concentraciones: 0 (control negativo); 325; 750; 1500; 3000 y 6000 µg a.e./L y el Cosmo-Flux®411F a: 0 (control negativo); 106,25; 212,5; 425; 850 y 1700 mg/L.

La media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones en las pruebas de laboratorio para el glifosato y Cosmo-Flux®411F se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados antes y después del recambio de las soluciones experimentales en las pruebas de laboratorio para el glifosato y Cosmo-Flux®411F.

<b>Fisicoquímicos</b>	<b>Glifosato (Roundup® Activo)</b>		<b>Cosmo-Flux®411F</b>	
	<b>Antes del recambio</b>	<b>Después del recambio</b>	<b>Antes del recambio</b>	<b>Después del recambio</b>
pH	7,43 (0,88)	7,56 (0,62)	7,54 (5,72)	7,17 (0,61)
Temperatura (°C)	24,8 (1,09)	23,0 (0,86)	24,4 (1,10)	22,3 (0,62)
Oxígeno (ppm)	6,04 (0,83)	6,63 (0,92)	5,01 (1,54)	6,70 (0,56)
Alcalinidad (mg/L)	59,2 (12,58)	64 (14,32)	81,8 (38,23)	102,8 (50,55)
Dureza (ppm)	94,2 (26,18)	93,3 (21,07)	93,4 (22,71)	89,6 (13,62)
Conductividad (µS/cm)	257,0 (45,02)	234,9 (37,38)	256,8 (42,64)	238,9 (36,43)

Fuente: Autor.

**4.5.2 Experimentos en Condiciones de Microcosmos.** Se siguió el mismo procedimiento citado para la aplicación de la mezcla glifosato-Cosmo-Flux®411F, sólo que en estos experimentos los agroquímicos se evaluaron por separado. El glifosato se estudió a las concentraciones: 0 (control negativo); 1,845; 3,69; 7,38; 14,76 y 29,52 Kg a.e./ha y el Cosmo-Flux®411F a: 0 (control negativo); 53,1; 106,2; 212,4; 424,8 y 849,6 mg/L. Estas concentraciones fueron preparadas por diluciones seriadas, pero a diferencia de los experimentos con la mezcla, su aplicación fue diluida en los microcosmos y no asperjada.

La media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos para el glifosato y Cosmo-Flux®411F se muestran en la Tabla 5 (Anexo D).

**Tabla 5.** Media y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos registrados a las 0 y 96 horas en las pruebas de microcosmos para el glifosato y Cosmo-Flux®411F.

<b>Fisicoquímicos</b>	<b>Glifosato (Roundup® Activo)</b>		<b>Cosmo-Flux®411F</b>	
	<b>0 horas</b>	<b>96 horas</b>	<b>0 horas</b>	<b>96 horas</b>
pH	7,11 (0,57)	7,11 (0,68)	7,26 (0,56)	7,05 (0,50)
Temperatura (°C)	23,18 (0,95)	22,30 (0,88)	23,39 (0,87)	22,82 (0,93)
Oxígeno (ppm)	6,86 (0,76)	4,96 (0,70)	6,44 (1,01)	3,08 (1,83)
Alcalinidad (mg/L)	63,75 (17,54)	46,38 (16,48)	63,13 (16,15)	45,63 (11,53)
Dureza (ppm)	98,38 (41,21)	92,25 (33,84)	91,75 (20,71)	93,88 (22,65)
Conductividad (µS/cm)	267,33 (58,32)	257,44 (32,83)	245,73 (59,29)	252,17 (38,02)

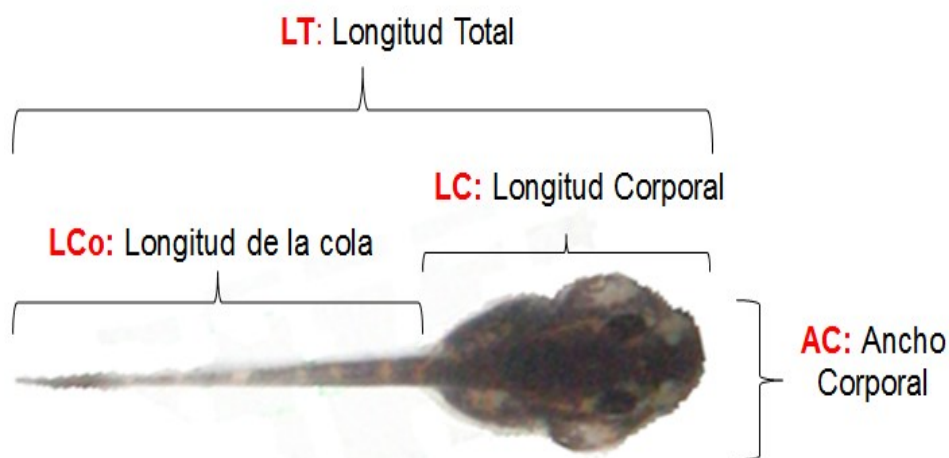
Fuente: Autor.

#### 4.6 EVALUACIÓN DE EFECTOS SUBLETALES EN RENACUAJOS DE ANUROS AL SER EXPUESTOS A LA APLICACIÓN INDIVIDUAL Y COMBINADA DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX®411F

Para el análisis de los efectos subletales de las especies expuestas a la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F, se tomaron los organismos sobrevivientes sin anomalías aparentes de las tres primeras concentraciones experimentales y el control, tanto en pruebas de laboratorio como en microcosmos donde la sobrevivencia de todas las especies fue superior al 50%. De igual manera, se eligieron los organismos expuestos a las dos primeras concentraciones experimentales y el control para la evaluación de los efectos subletales generados por la aplicación individual del glifosato y del Cosmo-Flux®411F.

**4.6.1 Tamaño Corporal.** Al finalizar los experimentos, diez renacuajos por cada concentración fueron fotografiados y posteriormente medidos, registrando el ancho corporal, longitud corporal, longitud de la cola y longitud total (Figura 8) con la ayuda del programa ImageJ 1.42j. Estos datos fueron analizados a través de un MANOVA y luego con ANOVAS factoriales en el programa InfoStat versión 2011, para establecer diferencias parciales entre las medidas morfométricas por cada concentración.

**Figura 8.** Mediciones morfométricas registradas en los renacuajos de estudio.

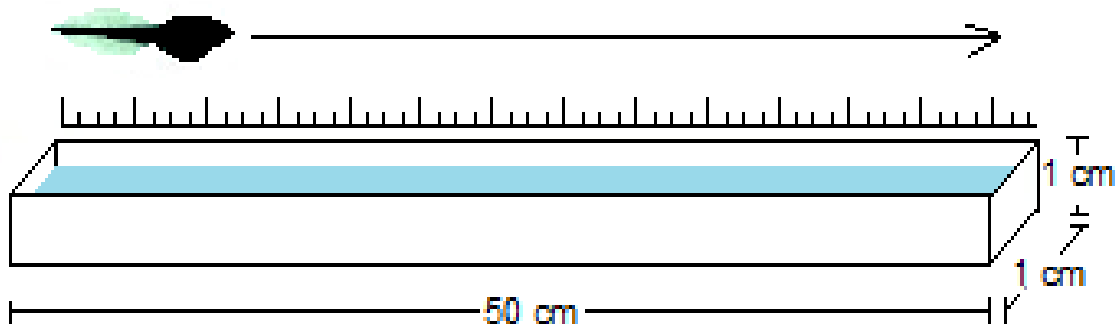


Fuente: Autor.



**4.6.2** Capacidad Locomotora. Diez renacuajos sobrevivientes de las pruebas de laboratorio y veinte renacuajos de las pruebas en microcosmos por concentración, se sometieron a una prueba de desempeño locomotor, la cual consistió en estimular suavemente con un pincel la parte posterior de la cola del renacuajo obligándolo a desplazarse a través de una pista de agua (50 cm de largo x 1 cm de ancho x 1 cm de alto) (Figura 9). Cada organismo se sometió a tres desplazamientos exitosos de los cuales se registró la máxima distancia recorrida (cm) y la máxima velocidad alcanzada (cm/s). Estos datos fueron analizados a través de un análisis multivariado de covarianza (MANCOVA) y posteriores análisis de covarianzas (ANCOVAS) en el programa InfoStat versión 2011, teniendo como covariable la longitud total de los organismos.

**Figura 9.** Montaje experimental de las pruebas de desempeño locomotor.



Fuente: Autor.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 TOXICIDAD DE LA MEZCLA GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y COSMO-FLUX® 411F EN RENACUAJOS DE ANUROS

**5.1.1 Toxicidad en Condiciones de Laboratorio.** La especie más sensible a la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F fue *H. crepitans* (CL<sub>50</sub>= 1424 µg a.e./L) y la más resistente *E. pustulosus* (CL<sub>50</sub>= 2799 µg a.e./L); mientras que *R. humboldti* y *R. marina* presentaron una letalidad intermedia (CL<sub>50</sub>= 2121 µg a.e./L y CL<sub>50</sub>= 2354 µg a.e./L, respectivamente) (Tabla 6). Estos valores de CL<sub>50</sub> coinciden con los reportados por Bernal et al. (2009a), en donde los renacuajos de la especie *H. crepitans* son los más sensibles (2064 µg a.e./L) a la exposición de la mezcla Glyphos®-Cosmo-Flux®411F y *E. pustulosus* los más resistentes (2787 µg a.e./L).

**Tabla 6.** Porcentaje de mortalidad, valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio.

Especies	Porcentaje de mortalidad (µg a.e./L)					CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% (µg a.e./L)
	325	750	1500	3000	6000	
<i>R. marina</i>	0	0	0	85	100	2354 (2107-2629)
<i>R. humboldti</i>	5	5	5	95	100	2121 (2012-2237)
<i>H. crepitans</i>	30	0	50	100	100	1424 (1136-1785)
<i>E. pustulosus</i>	0	0	15	45	100	2799 (2315-3384)

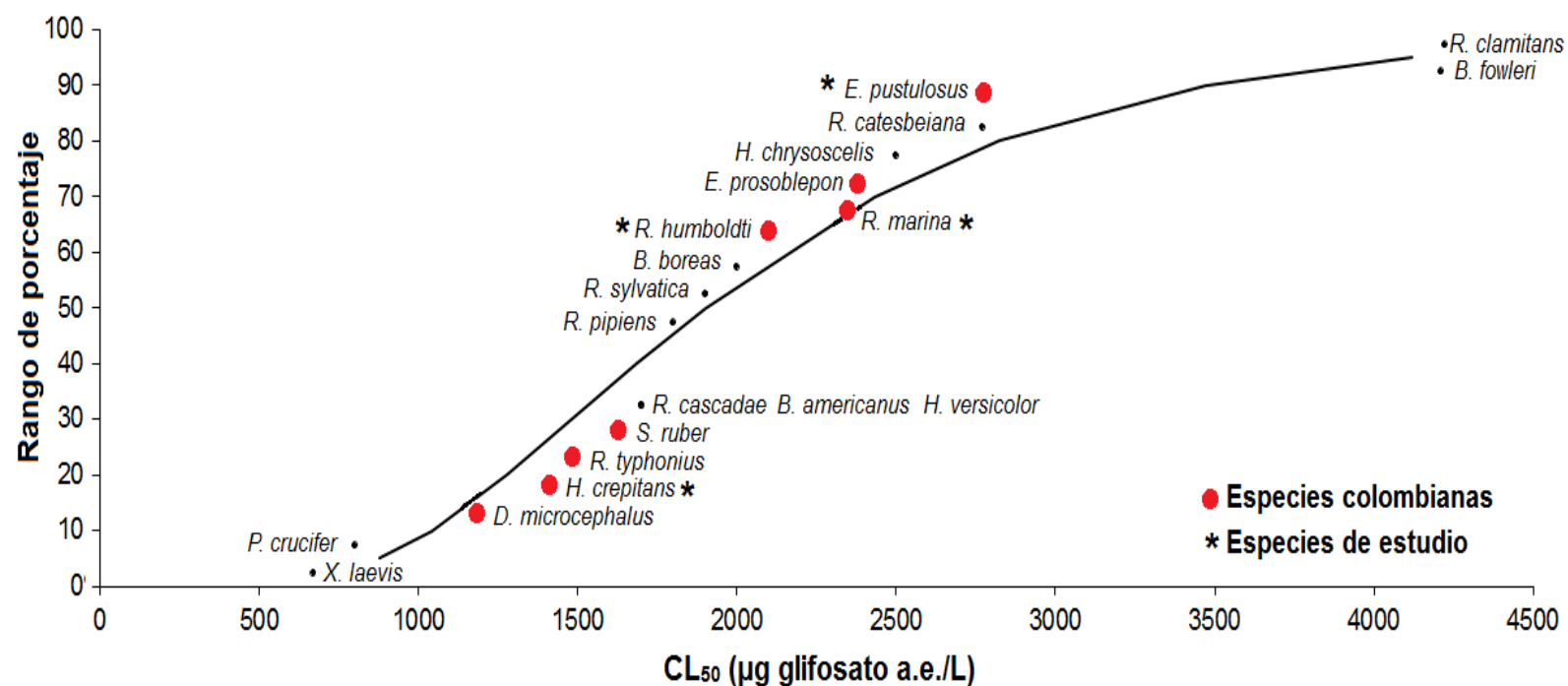
Fuente: Autor.

Los valores de CL<sub>50</sub> hallados para las especies de estudio fueron reunidos con los reportados en la literatura para otras especies expuestas a diferentes formulaciones de

glifosato bajo condiciones similares (Bernal et al., 2009a; Brain & Solomon, 2009; Edginton et al., 2004; Relyea & Jones, 2009; Moore et al., 2012) en un gráfico de distribución de sensibilidad de las especies (SSD) (Figura 10). El quinto centíl de la distribución de la toxicidad fue 876 µg a.e./L, indicando que el 95% de las especies colombianas, incluyendo las especies de estudio, presentan una sensibilidad similar a la reportada para otras especies de diferentes países (Figura 10).

Al comparar los valores CL<sub>50</sub> de las especies expuestas a la combinación del glifosato (Roundup® Activo) y del Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio con la concentración de glifosato empleada en el programa de erradicación de cultivos ilícitos (3,69 Kg a.e./ha= 5392,92 µg a.e./L) (Bernal et al., 2009a) y con la concentración empleada en la agricultura (1,77 Kg a.e./ha= 2586,84 µg a.e./L) (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007), se puede evidenciar que estos son menores, mostrando que dicha exposición en condiciones de laboratorio resulta tóxica para estas especies (a excepción de la especie más resistente a la mezcla *E. pustulosus* quien presenta un valor CL<sub>50</sub> mayor a la concentración empleada en la agricultura).

**Figura 10.** Gráfica de distribución de los valores de CL<sub>50</sub> de los renacuajos expuestos a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F y para otras formulaciones de glifosato.



Fuente: Autor.

**5.1.2 Toxicidad en Condiciones de Microcosmos.** Los valores CL<sub>50</sub> en condiciones de microcosmos no fueron calculados por el programa debido a la baja mortalidad a las concentraciones de exposición (Tabla 7), las cuales fueron hasta cuatro veces más altas que la tasa de aplicación en campo para el control de cultivos ilícitos (3,69 kg glifosato a.e./ha).

Los renacuajos presentaron una menor sensibilidad al ser expuestos en condiciones de microcosmos que bajo pruebas de laboratorio, lo cual puede ser atribuido a los sedimentos y materia orgánica presentes en este tipo de experimentos, los cuales degradan rápidamente el glifosato (Relyea, 2004; Tsui & Chu, 2004; Wojtaszek et al., 2004) y los tensoactivos tales como POEA (Wang et al., 2005). También, se puede deber a la no renovación de las soluciones experimentales en las pruebas de microcosmos, ya que se ha reportado una disminución en la concentración del glifosato en el medio de exposición a partir de las primeras 24 horas (Trumbo, 2005). En consecuencia, las concentraciones evaluadas de la mezcla pudieron haberse reducido a lo largo de las 96 horas de exposición y así generar una baja mortalidad.

**Tabla 7.** Porcentaje de mortalidad de las especies expuestas a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.

<b>Especies</b>	<b>Porcentaje de mortalidad (Kg a.e./ha)</b>			
	<b>3,69</b>	<b>7,38</b>	<b>14,76</b>	<b>29,52</b>
<i>R. marina</i>	0	18	4	2
<i>R. humboldti</i>	10	18	32	20
<i>H. crepitans</i>	12	12	2	22
<i>E. pustulosus</i>	0	6	4	4

Fuente: Autor.

## 5.2 TOXICIDAD DE LA APLICACIÓN INDIVIDUAL DEL GLIFOSATO (ROUNDUP® ACTIVO) Y EL COSMO-FLUX®411F EN RENACUAJOS DE ANUROS

**5.2.1 Toxicidad en Condiciones de Laboratorio.** La especie más sensible a la aplicación del glifosato fue *H. crepitans*, con un valor CL<sub>50</sub> de 1414 µg a.e./L (Tabla 8), y la más sensible al Cosmo-Flux®411F fue *R. humboldti*, con un CL<sub>50</sub> de 319 mg/L (Tabla 9).

**Tabla 8.** Porcentaje de mortalidad, valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Roundup® Activo bajo condiciones de laboratorio.

Especies	Porcentaje de mortalidad (µg a.e./L)					CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% (µg a.e./L)
	325	750	1500	3000	6000	
<i>R. marina</i>	0	25	40	90	100	1423 (1129-1794)
<i>R. humboldti</i>	5	10	0	75	100	2437 (2095-2834)
<i>H. crepitans</i>	20	10	55	100	100	1414 (1157-1728)
<i>E. pustulosus</i>	0	5	10	45	100	2789 (2295-3389)

Fuente: Autor.

**Tabla 9.** Porcentaje de mortalidad, valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio.

Especies	Porcentaje de mortalidad (mg/L)					CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% (mg/L)
	106,25	212,5	425	850	1700	
<i>R. marina</i>	0	0	15	10	85	1216 (1096-1350)
<i>R. humboldti</i>	5	50	65	70	100	319 (239-425)
<i>H. crepitans</i>	0	0	0	15	60	1457 (1114-1905)
<i>E. pustulosus</i>	5	5	0	25	80	1160 (853-1578)

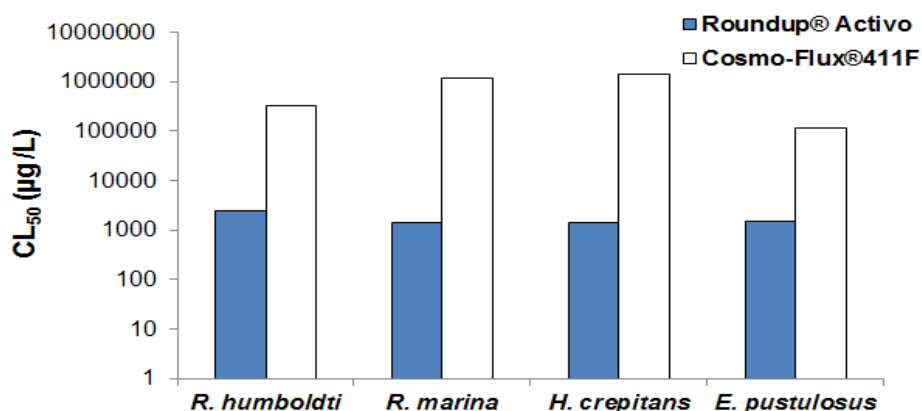
Fuente: Autor.

Al igual que la exposición a la mezcla bajo condiciones de laboratorio, la exposición individual del glifosato resultó tóxica para las especies de estudio, ya los CL<sub>50</sub> hallados bajo esta condición, en comparación con la concentración estimada de glifosato en el programa de erradicación de cultivos ilícitos (5392,92 µg a.e./L) y en la agricultura (2586,84 µg a.e./L), fueron menores, a excepción de la especie más resistente a la mezcla *E. pustulosus*, quien presentó un valor CL<sub>50</sub> mayor a la concentración empleada en la agricultura.

Para el caso de la exposición al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio, al comparar los CL<sub>50</sub> hallados para las especies con la concentración máxima del coadyuvante sugerida para su aplicación por Cosmoagro® (2013), de 10 ml/L= 1700 mg/L, estos valores fueron menores, indicando así que el coadyuvante es tóxico para las especies de estudio.

Adicionalmente, al comparar los promedios de la concentración letal media para la aplicación individual del glifosato (2015,75 µg a.e./L) y del Cosmo-Flux®411F (1038000 µg/L), el glifosato resulta ser aproximadamente 515 veces más tóxico que el Cosmo-Flux®411F (Figura 11).

**Figura 11.** Representación de los valores de CL<sub>50</sub> en las especies de estudio expuestas al glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones controladas de laboratorio.



Fuente: Autor.

Al comparar los intervalos de confianza al 95% de los valores  $CL_{50}$  encontrados en las pruebas de laboratorio para las especies expuestas a la mezcla Roundup® Activo y Cosmo-Flux®411F (Tabla 6) con los valores de toxicidad resultantes de la aplicación individual del Roundup® Activo (Tabla 8), estos no difieren significativamente, a excepción de la especie *R. marina*, para la cual resulta más tóxica la exposición individual al glifosato. Este resultado confirma la baja toxicidad que el Cosmo-Flux®411F aporta al interactuar con el glifosato.

**5.2.2 Toxicidad en Condiciones de Microcosmos.** Al comparar los valores de  $CL_{50}$  de las especies de estudio expuestas al glifosato (Roundup® Activo) bajo condiciones de microcosmos con la concentración empleada de glifosato para la erradicación de cultivos ilícitos y la concentración empleada en la agricultura (3,69 y 1,77 Kg de glifosato a.e./ha, respectivamente), estos resultan notablemente mayores, indicando que el glifosato no resulta tóxico para las especies de estudio (Tabla 10). No obstante, para *H. crepitans*, la especie más sensible al glifosato, la exposición podría representar un riesgo, en cuanto su  $CL_{50}$  ( $CL_{50}$ = 4 kg a.e./ha) se encuentra muy cercano a la concentración usada en el programa de erradicación de cultivos ilícitos. De igual manera, al comparar los valores de concentración letal media de las especies expuesta al Cosmo-Flux®411F, ajustados a litros por hectárea (Tabla 11), con la dosis de aplicación recomendada por Cosmoagro (0,5 a 1 L/ha), la exposición al Cosmo-Flux®411F no resultó tóxica para los renacuajos de ninguna de las especies de estudio. Incluso en una especie, *H. crepitans*, la mortalidad acumulada en cada concentración experimental fue tan baja que no se pudo calcular el valor de  $CL_{50}$  (Tabla 11).



**Tabla 10.** Porcentaje de mortalidad, valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Roundup® Activo bajo condiciones de microcosmos.

Especies	Porcentaje de mortalidad (kg a.e./ha)					CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% (kg a.e./ha)
	1,845	3,69	7,38	14,76	29,52	
<i>R. marina</i>	2	6	8	20	100	16,9 (15,2-18,9)
<i>R. humboldti</i>	24	4	92	100	100	5,1 (4,9-5,4)
<i>H. crepitans</i>	30	48	92	96	100	4,0 (3,4-4,7)
<i>E. pustulosus</i>	12	0	22	98	100	9,4 (8,7-10,2)

Fuente: Autor.

**Tabla 11.** Porcentaje de mortalidad, valores de CL<sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.

Especies	Porcentaje de mortalidad (mg/L)					CL <sub>50</sub> e intervalos de confianza al 95% (L/ha)
	53,1	106,2	212,4	424,8	849,6	
<i>R. marina</i>	0	4	6	2	60	2905,2 (2522,0-3346,7)
<i>R. humboldti</i>	14	26	78	70	100	632,3 (516,2-774,8)
<i>H. crepitans</i>	8	10	10	18	32	*
<i>E. pustulosus</i>	30	28	20	66	74	1304,9 (1035,2-1644,3)

\*Valor no calculado por el programa

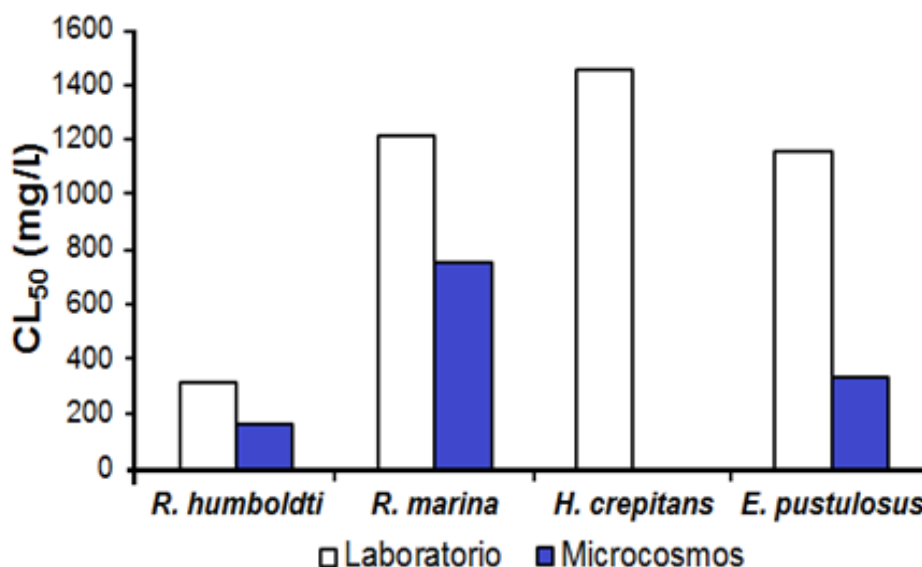
Fuente: Autor.

Teniendo en cuenta lo anterior, si se compara el valor CL<sub>50</sub> de la especie más sensible al coadyuvante, *R. humboldti* con un CL<sub>50</sub>= 632,3 L/ha, con la concentración máxima sugerida de aplicación para el Cosmo-Flux®411F (1 L/ha) este resulta 632 veces superior. De igual manera, si se compara la concentración del Cosmo-Flux®411F

utilizada como coadyuvante del glifosato para el control de cultivos ilícitos, en la proporción de 2,3% v/v (Cosmo-Flux®411F/glifosato) (Bernal et al., 2009a), correspondiente a 0,24 L/ha de Cosmo-Flux®411F, los datos de CL<sub>50</sub> muestran aún una menor toxicidad, en donde el CL<sub>50</sub> de la especie más sensible, *R. humboldti*, resulta ser 2634,5 veces superior. Por lo tanto, el Cosmo-Flux®411F como se aplica en campo no es letal para las especies de estudio.

La exposición en microcosmos, tanto para la aplicación individual del glifosato como de la mezcla glifosato-Cosmo-Flux®411F, se caracterizó por presentar una toxicidad baja en comparación con la exposición en laboratorio, la cual se atribuye a la presencia de sedimentos y materia orgánica incorporados en este montaje experimental, como fue discutido anteriormente. Sin embargo, contrariamente, el Cosmo-Flux®411F en condiciones de microcosmos presentó una toxicidad mayor que en las pruebas de laboratorio (Figura 12), lo cual podría ser atribuido a la reducción del oxígeno disuelto en las soluciones experimentales en el transcurso de las 96 horas de exposición (Tabla 5 y Anexo D). Dicha disminución en el oxígeno pudo deberse a la naturaleza química del Cosmo-Flux®411F (combinación de aceites parafinados), que crea una capa aceitosa entre las soluciones y el medio ambiente que dificulta el flujo de oxígeno, reduciéndolo notablemente, en especial porque bajo esta condición experimental no se dio la renovación de las soluciones experimentales. Si bien es cierto que los renacuajos en estadios tempranos pueden nadar a la superficie, como fue observado, la mayor parte del intercambio gaseoso lo realizan por su superficie cutánea (McDiarmid & Altig, 1999; pág 104), ya que la función primaria de los pulmones está relacionada con la flotabilidad más que con la respiración (McDiarmid & Altig, 1999; pág 106). Así, probablemente el intercambio gaseoso no resultó eficiente, generando una mayor sensibilidad a la exposición del Cosmo-Flux®411F bajo esta condición.

**Figura 12.** Comparación de los valores de CL<sub>50</sub> de las especies expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos.



Fuente: Autor.

### 5.3 EFECTOS SUBLETALES EN RENACUAJOS DE ANUROS

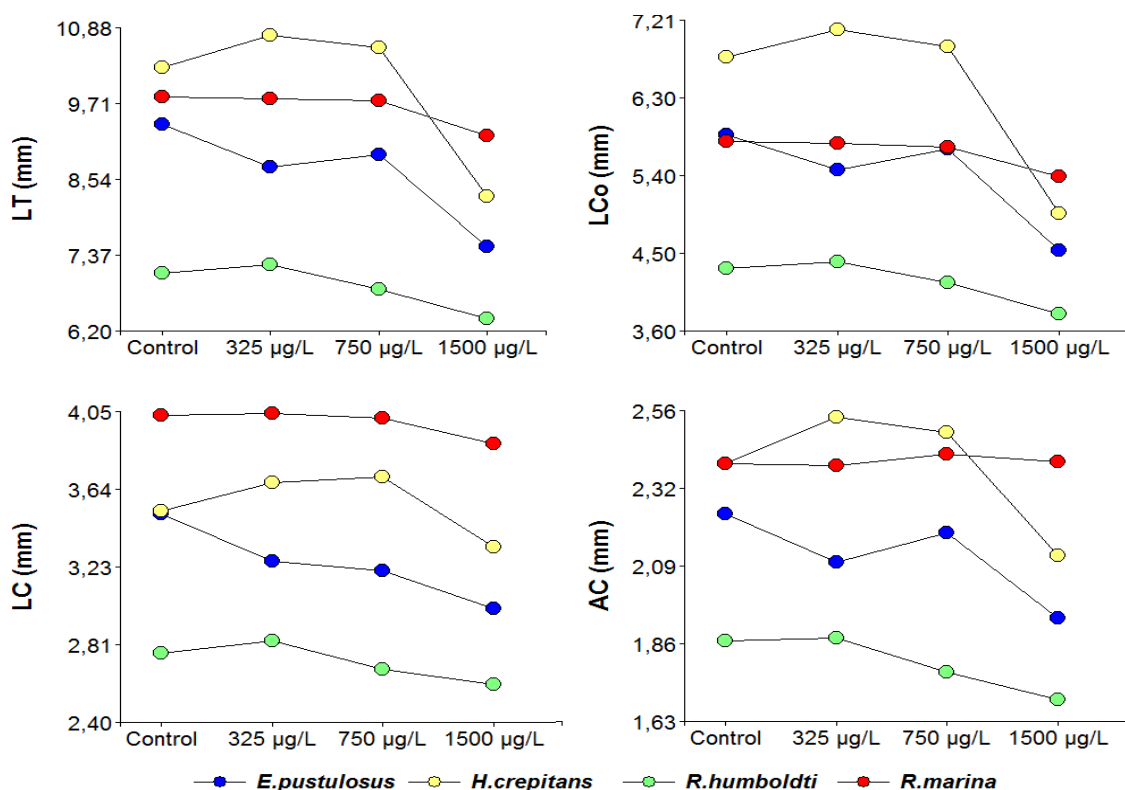
#### 5.3.1 Mezcla Glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F

**5.3.1.1 Tamaño Corporal.** Los organismos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio presentaron una reducción significativa en el tamaño corporal (Hotelling,  $T^2 = 0,46$ ;  $p < 0,0001$ ) siendo la concentración de 1500 µg/L la concentración que generó la diferencia en todas las variables evaluadas (Figura 13). Por el contrario, los organismos expuestos a la mezcla en condiciones de microcosmos no presentaron diferencias significativas en su tamaño corporal (Hotelling,  $T^2 = 0,03$ ;  $p = 0,8705$ ).

Esta notable reducción en la talla de los renacuajos expuestos a la mezcla bajo condiciones de laboratorio concuerda con el trabajo realizado por Relyea (2004), quien encontró que la exposición a pesticidas en organismos en estadio 25 de las especies *R. pipiens*, *R. clamitans*, *R. catesbeiana*, *B. americanus* e *H. versicolor* tenían una

reducción del crecimiento de hasta un 70%. También, Cauble y Wagner (2005), encontraron que las larvas de *R. cascadae* al ser expuestas al glifosato aceleraban su metamorfosis reduciendo significativamente su talla.

**Figura 13.** Media de las variables morfométricas evaluadas de los renacuajos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio.

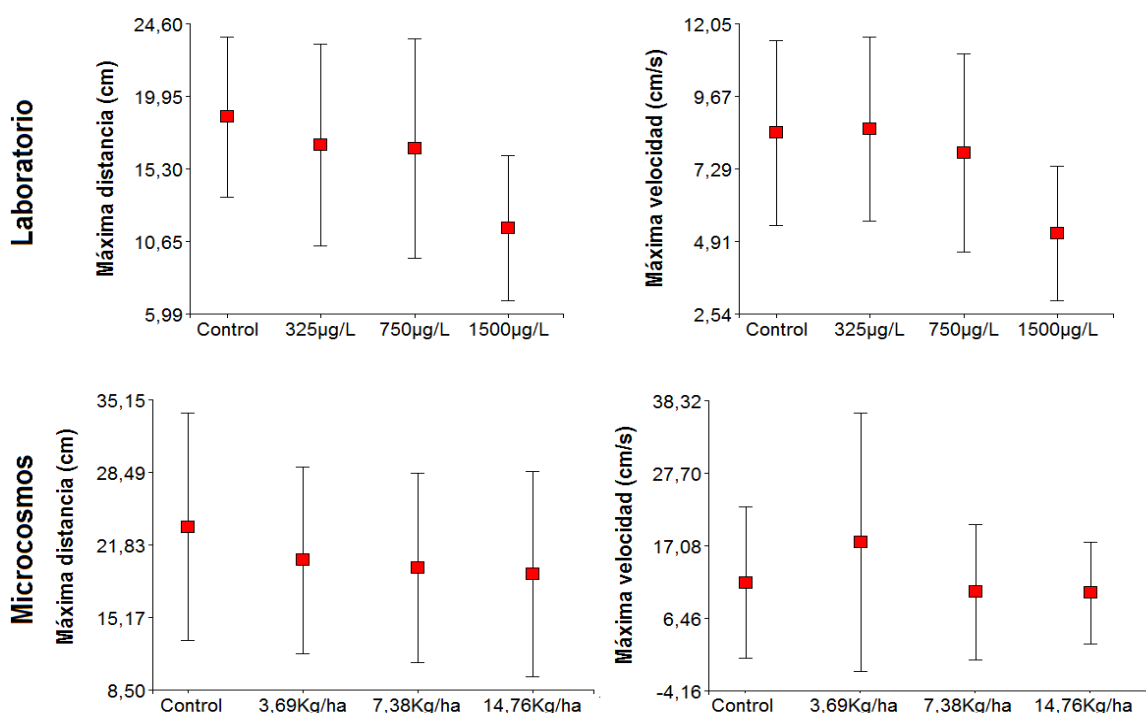


Fuente: Autor.

**5.3.1.2 Capacidad Locomotora.** Los renacuajos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F no presentaron alteraciones en su desempeño locomotor bajo ninguna de las condiciones experimentales evaluadas (Laboratorio: Hotelling,  $T^2 = 1,4$ ;  $p = 0,1083$  y Microcosmos: Hotelling,  $T^2 = 2,5$ ;  $p = 0,0827$ ) (Figura 14).

Este resultado contradice lo reportado en otros estudios que muestran que la exposición a los pesticidas causa una disminución significativa en la velocidad de nado en los renacuajos de *Rana blairi* (Bridges, 1997) y *Rana berlandieri* (Punzo, 2005). Aunque en la actualidad no se conocen estudios que evalúan la incidencia del glifosato en la locomoción en anuros, trabajos como el de Bernal et al. (2009b) en juveniles de *R. typhonius*, *R. granulosa*, *R. marina*, *S. ruber*, *C. prosoblepon* y *E. pustulosus* y adultos de *P. taeniatus*, *D. truncatus* indicaron la existencia de señales de toxicidad como la falta de movimiento normal o el movimiento lento en los organismos expuestos a la formulación glifosato (Glyphos®) y Cosmo-Flux®411F.

**Figura 14.** Media y desviación estándar de la máxima velocidad alcanzada y la máxima distancia recorrida por los renacuajos sobrevivientes a la exposición de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio y microcosmos.

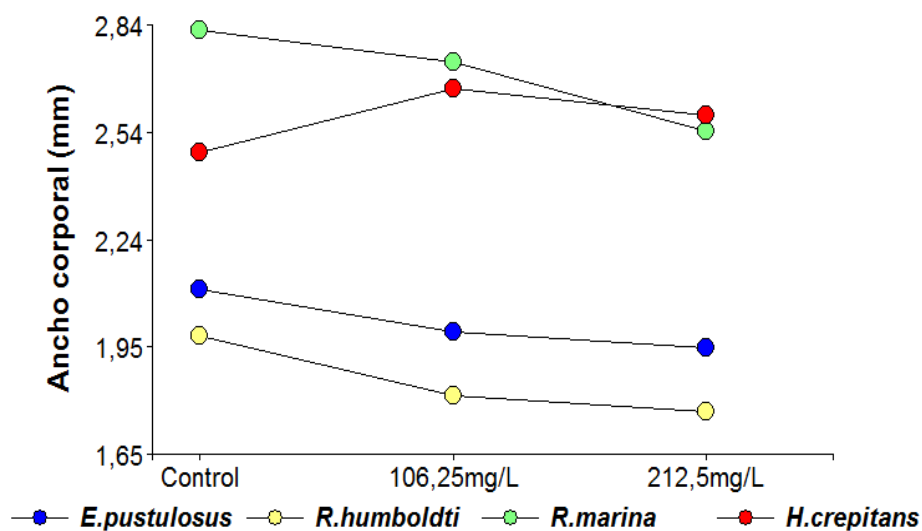


Fuente: Autor.

### 5.3.2 Aplicación Individual del Glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F

**5.3.2.1 Tamaño Corporal.** Las especies expuestas al glifosato bajo las dos condiciones experimentales no presentaron alteraciones en el tamaño corporal (Laboratorio: Hotelling  $T^2= 0,02$ ;  $p= 0,8433$  y Microcosmos: Hotelling  $T^2= 0,04$ ;  $p= 0,3647$ ). Por el contrario, los organismos expuestos al Cosmo-Flux®411F sí presentaron diferencias significativas en las medidas morfométricas evaluadas bajo las dos condiciones experimentales (Laboratorio: Hotelling  $T^2= 0,11$ ;  $p= 0,0041$  y Microcosmos: Hotelling  $T^2= 0,11$ ;  $p= 0,0020$ ). De las medidas registradas en las pruebas de laboratorio, el ancho corporal fue la variable que generó la diferencia entre las concentraciones evaluadas del coadyuvante y el control (Figura 15); mientras que en las pruebas de microcosmos, todas las variables evaluadas presentaron diferencias significativas con respecto del control (Figura 16).

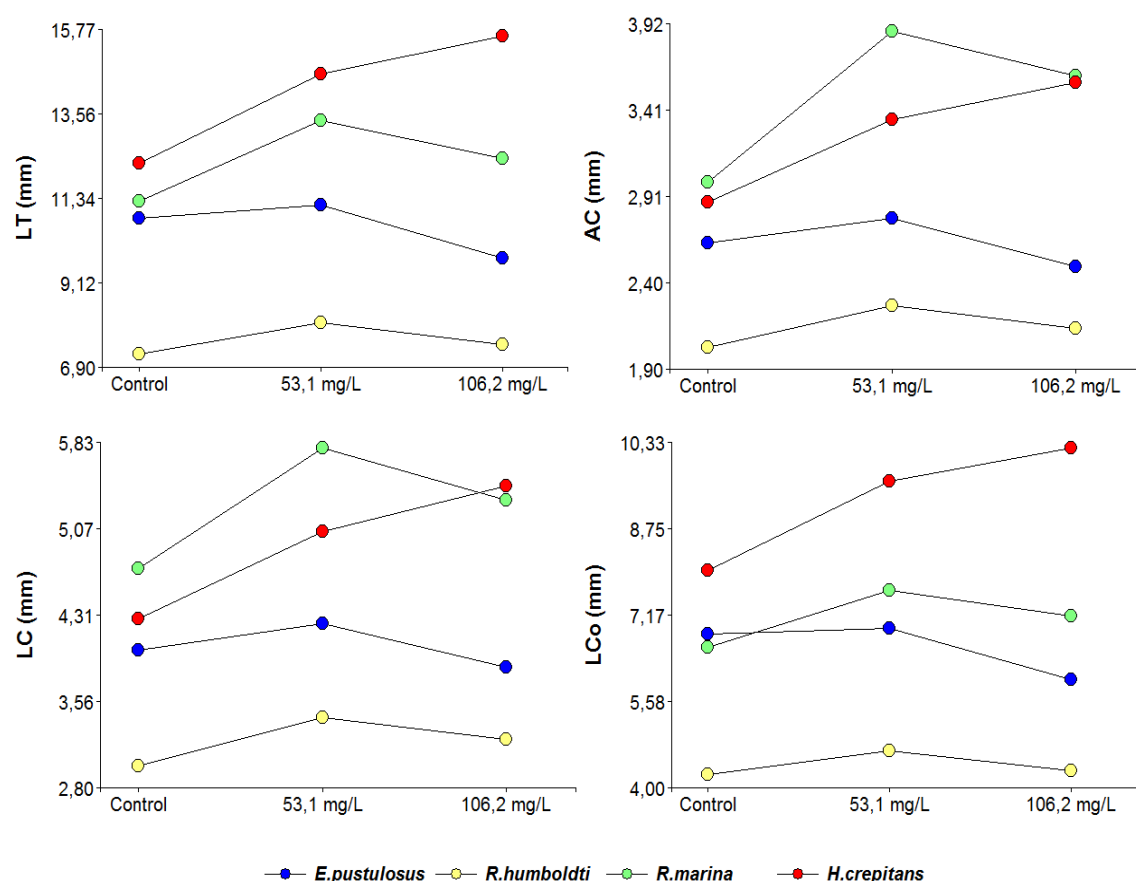
**Figura 15.** Promedio del ancho corporal en las cuatro especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F en condiciones de laboratorio.



Fuente: Autor.

A diferencia del trabajo realizado por Cauble y Wagner (2005), quienes encontraron que las larvas de *R. cascadae* al ser expuestas al glifosato (Roundup®) reducían significativamente su talla, los resultados del presente estudio indican que la exposición a la misma presentación de glifosato no afecta el tamaño corporal de los renacuajos. Por el contrario, la exposición al Cosmo-Flux®411F si generó alteraciones en el tamaño corporal de las especies a una concentración de 212,5 mg/L en laboratorio y 106,2 mg/L en microcosmos (Figuras 15 y 16), lo cual concuerda con el trabajo de Rondon et al. (2007), quienes encontraron efectos subletales en el pez *P. brachypomus* a concentraciones de Cosmo-Flux®411F lejanas a las reales de aplicación en campo.

**Figura 16.** Promedio de las medidas morfométricas de las especies de estudio expuestas al Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de microcosmos.



Fuente: Autor.

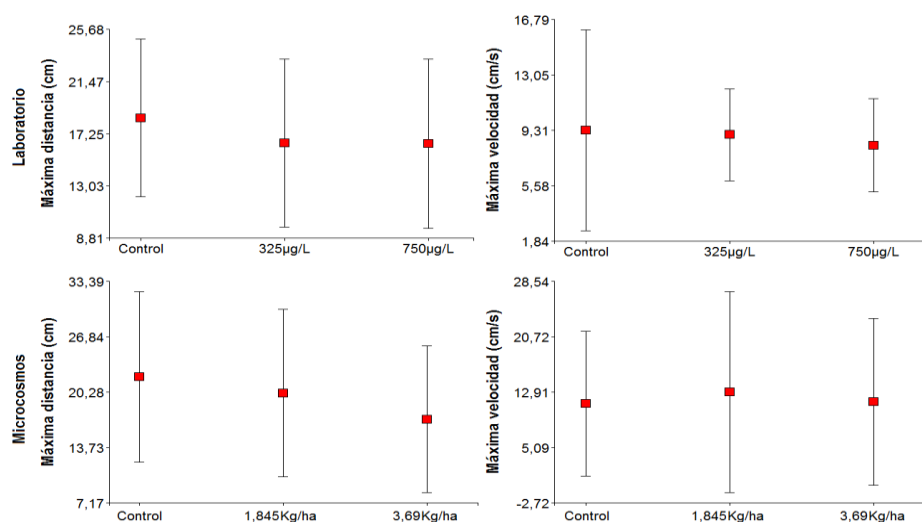
**5.3.2.2. Capacidad Locomotora.** Los organismos expuestos de manera individual al glifosato y al Cosmo-Flux®411F bajo las dos condiciones experimentales no presentaron alteraciones en el desempeño locomotor (pruebas de Glifosato en laboratorio: Hotelling  $T^2= 0,08$ ;  $p= 0,9469$  y en microcosmos: Hotelling  $T^2= 0,18$ ;  $p= 0,8956$ ; pruebas de Cosmo-Flux®411F en laboratorio: Hotelling  $T^2= 0,18$ ;  $p= 0,7969$  y en microcosmos: Hotelling  $T^2= 0,12$ ;  $p= 0,9430$ ) (Figura 17a y b).

La ausencia de efectos en la locomoción de los renacuajos expuestos al glifosato contradice estudios como el de Relyea (2012), quien señala que la exposición al glifosato en *R. sylvatica* y *R. pipiens* induce cambios en la cola de los renacuajos, los cuales podrían interferir en su capacidad natatoria, afectando su respuesta ante predadores (Belden & Blaustein, 2002; Kats, Kiesecker, Chivers & Blaustein, 2000). De otra parte, también se esperaba que la exposición al Cosmo-Flux®411F produjera alteraciones en el desempeño locomotor de los organismos, ya que generó diferencias en el tamaño corporal. Sin embargo, este resultado no se encontró ni siquiera a concentraciones muchas veces superiores a la aplicada en campo, lo que vuelve a confirmar el poco efecto tóxico de este coadyuvante en los renacuajos de las especies de estudio.

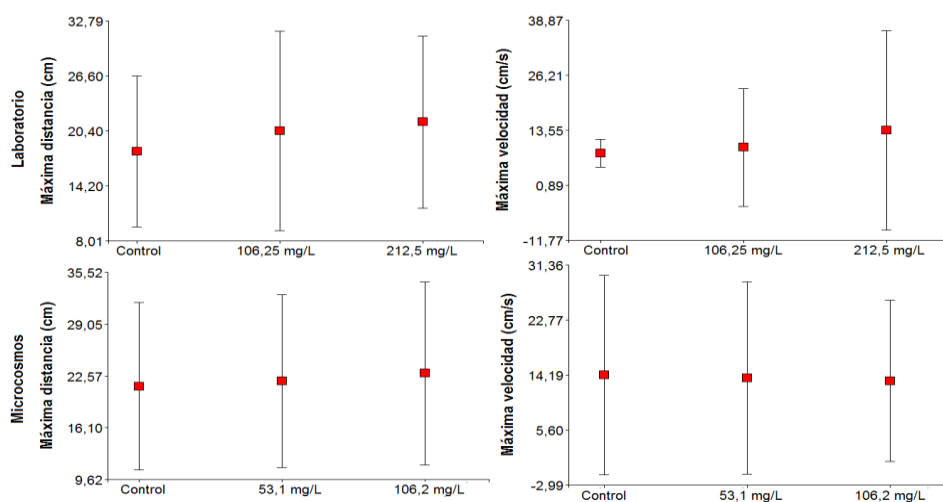


**Figura 17.** Media y desviación estándar de la máxima velocidad alcanzada y la máxima distancia recorrida por los renacuajos sobrevivientes a la exposición en condiciones de laboratorio y microcosmos de la aplicación individual del glifosato (Roundup® Activo) (a), y del Cosmo-Flux®411F (b).

**(a) Roundup® Activo**



**(b) Cosmo-Flux®411F**



Fuente: Autor.

## 6. CONCLUSIONES

- La exposición a la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F bajo condiciones de laboratorio resultó tóxica para las cuatro especies de anuros estudiados, mientras que bajo condiciones de microcosmos dicha exposición no resultó letal.
- La exposición individual al glifosato (Roundup® Activo) y al Cosmo-Flux®411F resultó tóxica sólo para los renacuajos evaluados bajo condiciones de laboratorio, mientras que en condiciones de microcosmos la exposición no resultó tóxica.
- La toxicidad de la mezcla está principalmente dada por el glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F aporta un efecto tóxico muy bajo.
- Al aplicar la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F, el coadyuvante Cosmo-Flux®411F podría actuar sinérgicamente con el glifosato y aumentar la aparición de alteraciones en la talla de los renacuajos.
- El glifosato (Roundup® Activo) y el Cosmo-Flux®411F aplicados de manera individual y combinada a concentraciones inferiores a los valores de CL<sub>50</sub> hallados, no alteraron el desempeño locomotor de ninguno de los renacuajos de estudio evaluados bajo condiciones de laboratorio y microcosmos.
- De acuerdo a los valores de CL<sub>50</sub> obtenidos bajo condiciones de microcosmos, los cuales semejan en mayor medida las condiciones reales de campo, y teniendo en cuenta las concentraciones de aplicación, la exposición a la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F no resultó letal. Por su parte, la exposición individual al coadyuvante Cosmo-Flux®411F tampoco fue letal

mientras que la exposición individual al glifosato (Roundup® Activo) representó un riesgo moderado.

## RECOMENDACIONES

- Determinar el éxito de la metamorfosis de los anuros expuestos en estadíos tempranos a la aplicación del glifosato y Cosmo-Flux®411F, con el propósito de establecer la posterior viabilidad de los organismos sobrevivientes a dicha exposición.
- Estudiar el efecto en el metabolismo hormonal y en el sistema inmunológico de los renacuajos de anuros expuestos a la aplicación del glifosato y Cosmo-Flux®411F.
- Evaluar la toxicidad y efectos subletales generados por del glifosato en condiciones *in-situ*, en donde se pueda contrastar los resultados en condiciones ambientales reales.
- Realizar estudios en anuros en donde se compare la toxicidad de las presentaciones comerciales de glifosato que contengan el surfactante POEA o Polioxietilamina y aquellas que no, ya que algunos estudios refieren que la toxicidad de los productos comerciales a base de glifosato se debe a este surfactante más que al ingrediente activo (sal de glifosato).

## LISTA DE REFERENCIAS

- AmphibiaWeb. (2013). Recuperado el 28 de Octubre de 2013, de <http://amphibiaweb.org/>.
- Belden, L. K. & Blaustein, A. R. (2002). Exposure of red-legged frog embryos to ambient UV-B radiation in the field negatively affects larval growth and development. *Oecologia*, 130(4), 551-554.
- Bernal, M. H., Alton, L. A., Cramp, R. L. & Franklin, C. E. (2011). Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on developing anuran embryos and larvae?. *Journal of Comparative Physiology Part B*, 181(7), 973-980.
- Bernal, M., Solomon, K. & Carrasquilla, G. (2009a). Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux to larval Colombian frogs 1. Laboratory acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72, 961–965.
- Bernal, M., Solomon, K. & Carrasquilla, G. (2009b). Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos®) and Cosmo-Flux to larval and juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 72, 966-973.
- Blaustein, A. R. & Wake, D. B. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272(4), 56-61.
- Brain, R. A. & Solomon, K. R. (2009). Comparison of the hazards posed to amphibians by the glyphosate spray control program versus the chemical and physical activities of coca production in Colombia. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 72, 937-948.

- Bridges, C. M. (1997). Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1935-1939.
- Cauble, K. & Wagner, R. S. (2005). Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 429-435.
- Chen, C. Y., Hathaway, K. M. & Folt, C. L. (2004). Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 823-831.
- Cochran, D. M. & Goin, C. J. (1970). *Frogs of Colombia*. United State: Smithsonian Institution Press City of Washington.
- Collins, J. P. & Storfer, A. (2003). Global amphibian declines: Sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9, 89-98.
- Cosmoagro. (2013). Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de <http://www.cosmoagro.com/>
- Costa, M. J., Montairo, D. A., Oloveira-Neto, A. L., Rantin, F. T. & Kalinin, A. L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17, 153-163.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. (1986). *Biology of Amphibians*. London: McGraw-Hill Book Company.
- Duke, S. O. & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64, 319-325.
- Edginton, A., Sheridan, P., Stephenson, G., Thompson, D. & Boermans, H. (2004). Comparative effects of pH and Vision herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 815-822.

- Eslava, P. R., Ramírez, W. F. & Rondón, I. S. (2007). *Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos*. Orinoquia, Colombia: Instituto de Acuicultura de los Llanos.
- Frost, D. R., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R. H., Haas, A., Haddad, C. F. B.,... Green, M. (2006). The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297, 1-370.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16, 183-190.
- Guayara-Barragán, M. G. & Bernal, M. H. (2012). Fecundidad y fertilidad en once especies de anuros colombianos con diferentes modos reproductivos. *Caldasia*, 34, 483-496.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K.,... Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact?. *Environmental Health Perspectives*, 114, 40-50.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K. & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1928-1938.
- Instituto A. Von Humboldt (2010). Resolución 383/2010 - Declaración de especies amenazadas. Recuperado el 15 de Octubre de 2013, de <http://www.humboldt.org.co>.
- IUCN. (2013). Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de <http://www.iucnredlist.org/>
- Kats, L. B., Kiesecker, J. M., Chivers, D. P. & Blaustein, A. R. (2000). Effects of UV-B radiation on anti-predator behavior in three species of amphibians. *Ethology*, 106(10), 921-931.
- Lajmanovich, R., Lorenzatti, E., Maitre, M., Enrique, S. & Peltzer, P. (2003). Comparative acute toxicity of the commercial herbicides glyphosate to

- neotropical tadpoles *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(4), 364-367.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B. & Wilson, S. P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risk in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157, 2903-2927.
- Matschke, J. & Machaclova, I. (2002). Changes in the content of in-dole-3-acetic acid and cytokinins in spruce, fir and oak trees after herbicide treatment. *Biologia Plantarum*, 45, 375-382.
- Mattonn, A. (2000). El declive de los anfibios. *Worldwatch Institute*, 23, 11-21.
- McDiarmid, R. W. & Altig, R. (1999). *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. United States: University of Chicago Press.
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. (2007). Resolución Número 1435. Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de [http://www.minambiente.gov.co/documentos/res\\_1435\\_150807.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_1435_150807.pdf).
- Moore, L. J., Fuentes, L., Rodgers, J. H., Bowman, W. W., Yarrow, G. K., Chao, W. Y. & Bridge, W. C. (2012). Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78(2012), 128-133.
- Plötner, J. & Matschke, J. (2012). Akut-toxische, subletale und indirekte wirkungen von glyphosat und glyphosathaltigen herbiziden auf Amphibien – eine Übersicht. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 19, 1-20.
- Pough, F. H. & Wilson, R. E. (1998). Acid precipitation and reproductive success of *Ambystoma* salamanders. *Water, Air, & Soil Pollution*, 7, 307-316.
- Punzo, F. (2005). Effects of insecticide (carbaryl) exposure on activity and swimming performance of tadpoles of the Rio Grande Leopard Frog, *Rana berlandieri* (Anura: Ranidae). *Texas Journal of Science*, 57(3), 263-272.



- Relyea, R. A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1737-1742.
- Relyea, R. A. (2005). The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15, 1118-1124.
- Relyea, R. A. & Jones, D. K. (2009). The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 2004-2008.
- Relyea, R. A. (2012). New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecological Applications*, 22(2), 634-647.
- Rondón, I., Ramírez, W. & Eslava, P. (2007). Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux®411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(4), 431-446.
- Savage, J. M. (2002). *The amphibians and reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna Between two Continents, Between two Seas*. USA: The University of Chicago Press.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J. & Sanin, L. H. (2007). Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 190, 43-125.
- Solomon, K. R., Anadón, A., Cerdeira, A. L., Marshall, J. & Sanin, L. H. (2005). "Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente," Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD).

- Steinrücken, H. C. & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, 1207-1212.
- Storfer, A. (2003). Amphibian declines: future directions. *Diversity and Distributions*, 9, 151-163.
- Trumbo, J. (2005). An assessment of the hazard of a mixture of the herbicide Rodeo® and the non-ionic surfactant R-11® to aquatic invertebrates and larval amphibians. *California fish and game*, 91(1), 38-46.
- Tsui, M. T. & Chu, L. M. (2004). Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment pore water exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 316-323.
- Van Leeuwen, C. J. & Vermeire, T. G. (2007). *Risk assessment of chemicals: An introduction. Second edition*. Dordrecht (Netherlands): Springer.
- Wagner, N. & Lötters, S. (2013). *Possible correlation of the worldwide amphibian decline and the increasing use of glyphosate in the agrarian industry*. Germany: Federal agency for nature conservation.
- Wang, N., Besser, J. M., Buckler, D. R., Honegger, J. L., Ingersoll, C. G., Johnson, B. T.,... McKee, M. J. (2005). Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere*, 59, 545-551.
- Williams, B. K. & Semlitsch, R. D. (2010). Larval responses of three midwestern anurans to chronic low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 819-827.
- Wojtaszek, B., Staznik, B., Chartrand, D., Stephenson, G. & Thompson, D. (2004). Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4), 832-842.

# **ANEXOS**

**Anexo A.** Fotografías de las presentaciones comerciales de los agroquímicos empleados **1.** Roundup® Activo y **2.** Cosmo-Flux®411F.



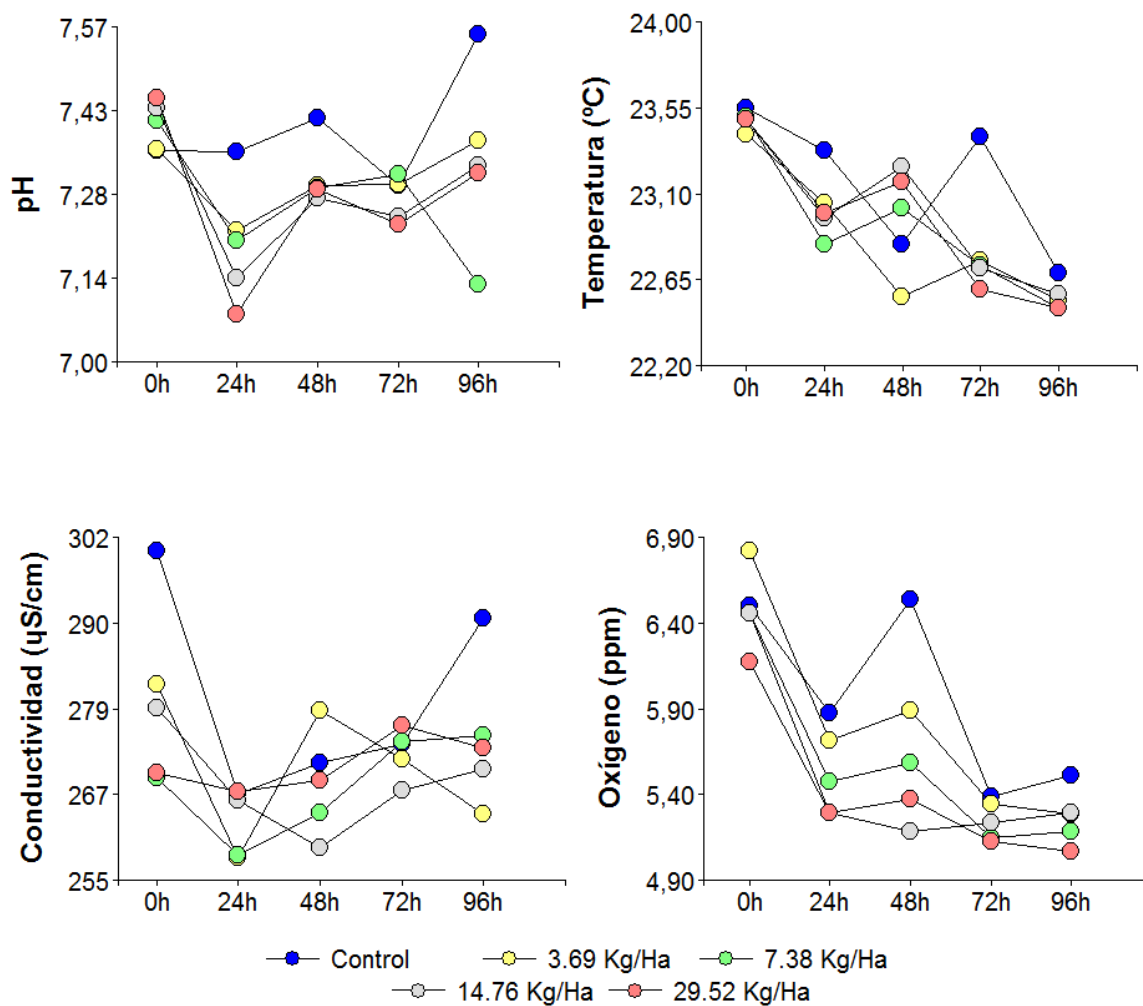
**Anexo B.** Fotografías de los lugares de colecta de las posturas de huevos de las especies de estudio en el departamento del Tolima: **1.** Corregimiento Potrerillo, municipio de Coello, **2.** Payandé, municipio de San Luis y **3.** Universidad del Tolima, municipio de Ibagué.





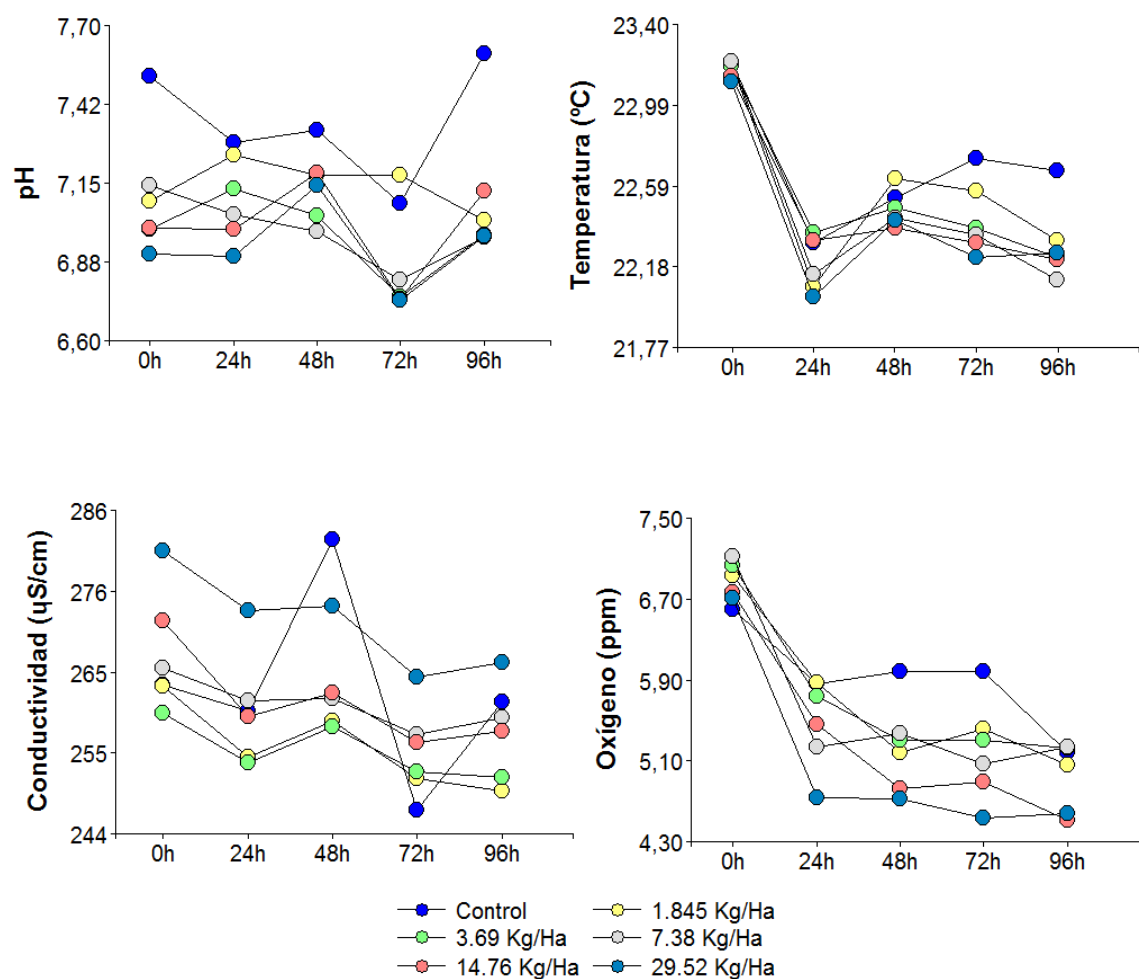


**Anexo C.** Gráfica de tendencia general de los parámetros fisicoquímicos en los experimentos realizados bajo condiciones de microcosmos en las pruebas de toxicidad de la mezcla glifosato (Roundup® Activo) y Cosmo-Flux®411F.



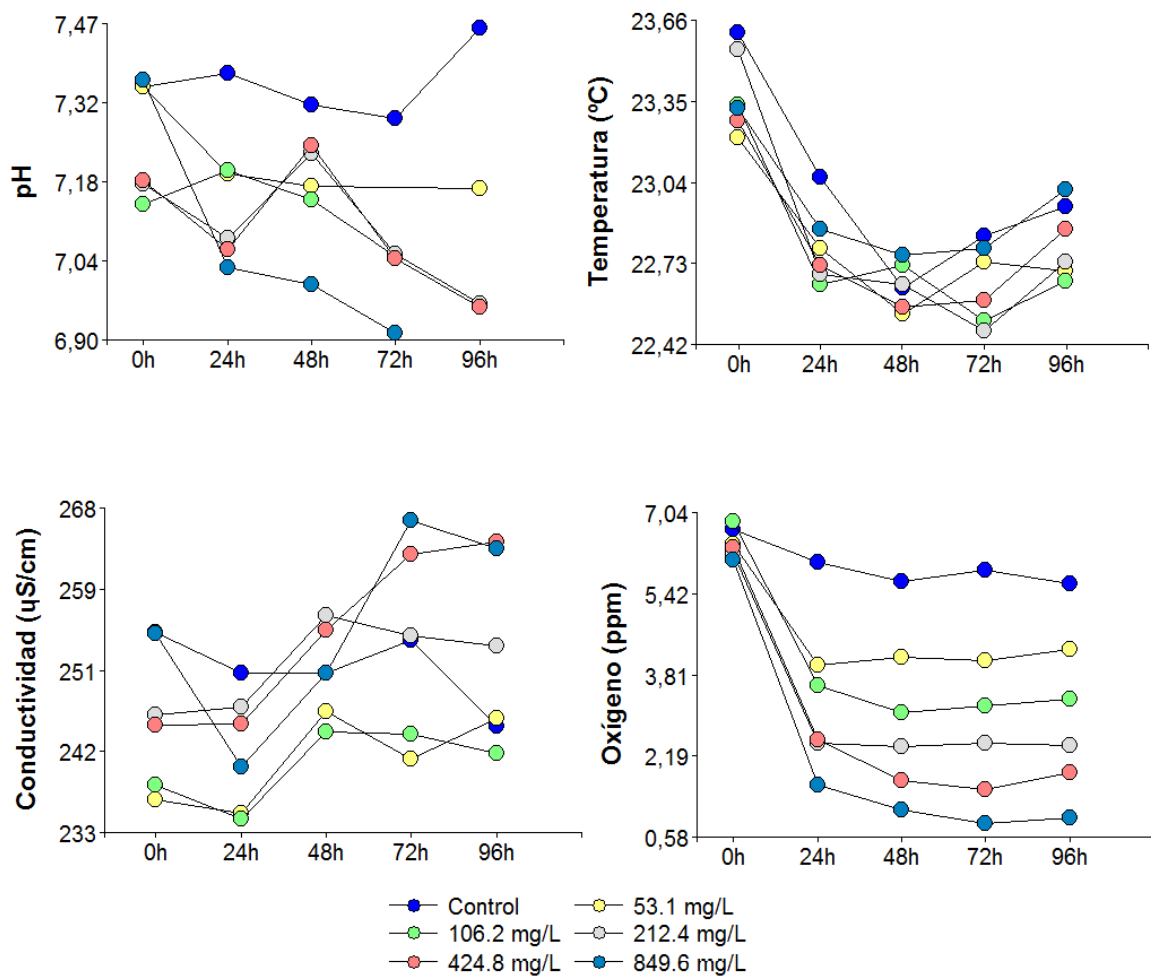
**Anexo D.** Gráfica de tendencia general de los parámetros fisicoquímicos en los experimentos realizados bajo condiciones de microcosmos en las pruebas de toxicidad de la aplicación individual del **1.** glifosato (Roundup® Activo) y **2.** del Cosmo-Flux®411F.

### 1. Roundup® Activo





## 2. Cosmo-Flux®411F



**Anexo E.** Resumen de los resultados obtenidos en el estudio.

<div> <div>Agroquímicos</div> <div>Efectos</div> </div>	<div>Mezcla:</div> <div>Roundup® Activo +</div> <div>Cosmo-Flux® 411F</div>	<div>Aplicación individual</div> <div>del Cosmo-Flux® 411F</div>	<div>Aplicación individual</div> <div>del Roundup® Activo</div>
	<div>Laboratorio: <b>tóxico</b></div> <div>Microcosmos: <b>no tóxico</b></div>	<div>Laboratorio: <b>tóxico</b></div> <div>Microcosmos: <b>no tóxico</b></div>	<div>Laboratorio: <b>tóxico</b></div> <div>Microcosmos: <b>no tóxico</b></div>
<div>Tamaño</div> <div>Corporal</div>	<div>Laboratorio: <b>afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>no afecta</b></div>	<div>Laboratorio: <b>afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>afecta</b></div>	<div>Laboratorio: <b>no afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>no afecta</b></div>
<div>Capacidad</div> <div>Locomotora</div>	<div>Laboratorio: <b>no afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>no afecta</b></div>	<div>Laboratorio: <b>no afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>no afecta</b></div>	<div>Laboratorio: <b>no afecta</b></div> <div>Microcosmos: <b>no afecta</b></div>